
BACHELORARBEIT

Herr
Fabian Dressel

**Herstellung, Evaluierung und
Charakterisierung von
Luciferase-exprimierenden
Candida albicans-Stämmen**

Mittweida, 2017

BACHELORARBEIT

Herstellung, Evaluierung und Charakterisierung von Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämmen

Autor:
Herr

Fabian Dressel

Studiengang:
Biotechnologie

Seminargruppe:
BT14wU-B

Erstprüfer:
Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus

Zweitprüfer:
Dr. Slavena Vylkova

weitere Betreuer:
Dr. rer. nat. Christin Leitzinger

Einreichung:
Jena, 24.10.2017

Verteidigung/Bewertung:
Mittweida, 2017

Bibliographische Beschreibung:

Dressel, Fabian: Herstellung, Evaluierung und Charakterisierung von Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämmen. - 2017. - 10, 44, 0 S. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Angewandte Computer- und Biowissenschaften, Bachelorarbeit, 2017

Englischer Titel

Generation and characterization of luciferase-expressing bioluminescent strains in the fungal pathogen *Candida albicans*

Kurzbeschreibung:

Im Rahmen dieser Arbeit wird die Herstellung, Evaluierung und *in vitro*-Charakterisierung Luciferase-exprimierender *Candida albicans*-Stämme gezeigt, welche in einem späteren Brandwundeninfektionsmodell an Ratten eingesetzt werden, um den Infektionsverlauf nach Applikation von *Candida albicans in vivo* zu untersuchen.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all jenen danken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Bachelorarbeit beigetragen haben. Zunächst geht mein Dank an Frau Dr. Slavena Vylkova, welche mir die Möglichkeit eröffnet hat, meine Bachelorarbeit am Zentrum für Innovationskompetenz Septomics zu schreiben. Darüber hinaus danke ich ihr für die Begutachtung dieser Arbeit.

Ebenfalls möchte ich mich bei Prof. Dr. rer. nat. Petra Radehaus für die Betreuung und Ratschläge bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Christin Leitzinger, welche meine Bachelorarbeit betreut hat und mir stets mit Rat und konstruktiver Kritik zur Seite stand.

Abschließend möchte ich den tollen Teams der Arbeitsgruppen „Host Fungal Interfaces“ und „Fungal Septomics“ danken, die für eine angenehme Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mit interessanten Beiträgen und kleinen Ratschlägen mein Leben weiter bereichert haben.

Fabian Dressel

Jena, den 24.10.2017

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	IV
Abkürzungsverzeichnis	V
1 Einleitung	1
1.1 <i>Candida albicans</i> als Kommensale.....	1
1.2 <i>Candida albicans</i> als Pathogen	1
1.3 <i>Candida albicans</i> als Biofilm-Bildner.....	3
1.4 Brandwundeninfektionen durch <i>Candida albicans</i>	3
1.5 Analyse des Infektionsverlaufs im Tiermodell mittels Lumineszenz	5
2 Zielstellung.....	7
3 Material	8
3.1 Software	8
3.2 Verwendete <i>Candida albicans</i> -Stämme.....	8
3.3 Oligonukleotide	8
3.4 Plasmide und Enzyme.....	9
3.5 Medien	10
3.6 Chemikalien	10
3.7 Puffer und Lösungen	10
3.8 Kits	11
3.9 Verbrauchsmaterialien.....	11
3.10 Hilfsmittel.....	11
3.11 Geräte	11
4 Methoden.....	13
4.1 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung biolumineszenter <i>Candida albicans</i> -Stämme	13
4.1.1 Restriktion des Luciferase-enthaltenden Plasmids pADH1: <i>luc</i> (opt) zur Klonierung in die <i>stp2Δ</i> und <i>ahr1Δstp2Δ</i> Deletionsmutanten	13
4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	13
4.1.3 Gelaufreinigung mittels QIAquick Gel Extraktion Kit	14
4.1.5 Transformation	14
4.1.6 Kolonie-Polymerasekettenreaktion	15

4.2	Mikrobiologische Evaluierung der biolumineszenten <i>Candida albicans</i> -Stämme	15
4.2.1	Kultivierung der <i>Candida albicans</i> -Stämme	15
4.2.2	Nachweis der Biolumineszenz	16
4.2.3	Wachstumskurven	16
4.2.4	pH-Wert Messung	17
4.2.5	Filamentierung	17
4.2.6	Morphologie	17
4.3	Statistik	17
5	Ergebnisse	18
5.1	Herstellung Luciferase-exprimierender <i>C. albicans</i> -Stämme	18
5.2	Luciferase-exprimierende <i>C. albicans</i> -Stämme emittieren ein stärkeres Lichtsignal als ihre Kontrollstämme	20
5.3	Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Eigenschaften der untersuchten <i>C. albicans</i> -Stämme	22
6	Diskussion	31
6.1	Herstellung der Luciferase-exprimierenden Stämme <i>stp2Δ</i> und <i>ahr1Δstp2Δ</i>	31
6.2	Verifizierung der Luciferase-Expression in verschiedenen <i>Candida albicans</i> -Stämmen mittels Biolumineszenz	32
6.3	Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Eigenschaften der untersuchten <i>Candida albicans</i> -Stämme	34
7	Ausblick	39
8	Zusammenfassung	40
9	Summary	41
	Literaturverzeichnis	42
	Selbstständigkeitserklärung	44

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Hyphale Infektion eines Organismus durch pathogene Hefepilze.....	2
Abb. 2:	Dreidimensionale Darstellung der Haut und ihrer Bestandteile.....	4
Abb. 3:	Funktionsprinzip der Firefly Luciferase.....	6
Abb. 4:	pUC-Plasmid mit <i>Candida albicans</i> -optimierter Luciferase unter Kontrolle des <i>ACT1</i> -Promotors und <i>URA3</i> als Selektionsmarker.....	9
Abb. 5:	Plasmid mit <i>Candida albicans</i> -optimierter Luciferase unter Kontrolle des <i>ADH1</i> -Promotors und <i>SAT1</i> als Selektionsmarker.	9
Abb. 6:	Die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktion von Plasmid #138 mit <i>NarI</i> und <i>SacI</i> ergab Fragmente mit einer Größe von 2867 bp (Rückgrat) und 5028 bp (Transformationskassette).....	18
Abb. 7:	Die Verifizierung der untersuchten Kolonien zeigt eine erfolgreiche Integration des Luciferase-Gens in den <i>ADH1</i> -Locus.....	19
Abb. 8:	Im Gegensatz zu den Kontrollstämmen emittieren Luciferase-exprimierende <i>Candida albicans</i> -Stämme ein starkes Lumineszenzsignal, welches aber über die Zeit abnimmt.....	21
Abb. 9:	Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf das Wachstum der untersuchten <i>Candida albicans</i> -Stämme.....	23
Abb. 10:	Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Entwicklung des pH-Wertes der untersuchten <i>Candida albicans</i> -Stämme.....	25
Abb. 11:	Vergleich der Hyphen-Hefenform zeigt ein stark reduziertes Hyphenwachstum aller Stämme unter YNB (CAA) Medium.	27
Abb. 12:	Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Hyphenbildung der untersuchten <i>Candida albicans</i> -Stämme.....	28
Abb. 13:	Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Morphologie der untersuchten <i>Candida albicans</i> -Stämme.....	30

Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Software.....	8
Tab. 2:	Liste der verwendeten <i>C. albicans</i> Stämme	8
Tab. 3:	Liste der verwendeten Oligonukleotide.....	8
Tab. 4:	Liste der verwendeten Flüssig- und Festmedien	10
Tab. 5:	Liste der verwendeten Chemikalien	10
Tab. 6:	Liste der verwendeten Puffer und Lösungen	10
Tab. 7:	Liste der verwendeten Kits und DNA Fragmente.....	11
Tab. 8:	Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	11
Tab. 9:	Liste der verwendeten Hilfsmittel.....	11
Tab. 10:	Liste der verwendeten Geräte	11
Tab. 11:	Übersicht über die Primerkombinationen der Kolonie-PCR	15

Abkürzungsverzeichnis

ACT1	Actin 1
ADH1	Alkoholdehydrogenase 1
AHR1	Transkriptionsfaktor: Adhäsion und Hyphenregulator 1
AMP	Adenosinmonophosphat
AmSu	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare [engl. base pairs]
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
CAA	Aminosäuren [engl. casaminoacids]
ESD	Ausreißertest nach Grubbs [engl. extreme studentized deviate]
FBS	Fötale Bovines Serum
fwd	vorwärts [engl. forward]
Glc	Glukose
Luc, <i>luc</i> (opt)	Luciferase, <i>Candida albicans</i> -optimierte Luciferase
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung [engl. Phosphate buffered saline]
PPi	Pyrophosphat
PCR	Polymerase-Kettenreaktion [engl. Polymerase chain reaction]
rev	rückwärts [engl. reverse]
rpm	Umdrehungen pro Minute [engl. rounds per minute]
RPMI	Hypheninduzierendes Flüssigmedium [engl. Roswell Park Memorial Institute]
RT	Raumtemperatur
<i>spp.</i>	Spezies
SPS	Signal-verarbeitendes-System [engl. Signal Processing Systems]
STP2	Transkriptionsfaktor: Transkriptionsregulator 2 [engl. species-specific pre-tRNA processing 2]
YNB	Basismedium zur Anzucht von Hefen [engl. yeast nitrogen base]
YPD	Komplexmedium zur Anzucht von Hefen [engl. yeast extract peptone dextrose]
ÜN	Über-Nacht

1 Einleitung

1.1 *Candida albicans* als Kommensale

Candida albicans zählt zur Gattung der Hefepilze und umfasst zirka 150 Spezies. Dieser Pilz, welcher im normalen menschlichen Mikrobiom und bei den meisten Individuen als lebenslanger, harmloser Kommensale vorkommt, besiedelt verschiedene Körperoberflächen, wie beispielsweise die Vaginalwand, den Darmtrakt die Mundhöhle und die Hautoberfläche gesunder Individuen (Scherer and Magee 1990) (Tsui, Kong, and Jabra-rizk 2016)(Seneviratne, Jin, and Samaranayake 2008). Durch Störungen des Immunstatus oder Veränderungen des mikrobiellen Gleichgewichts, wie z. B. bei Individuen mit langfristiger Antibiotikatherapie kann ein Wandel von *C. albicans* als Kommensale zum invasiven Pathogen begünstigt werden (Kumamoto and Vences 2005).

1.2 *Candida albicans* als Pathogen

Wie bereits in Abschnitt 1.1 erwähnt, kann *C. albicans* als opportunistischer Krankheitserreger Infektionen verursachen, die von oberflächlichen Infektionen der Haut bis hin zu lebensbedrohlichen Infektionen mit einer hohen Sterblichkeitsrate reichen (Mayer, Wilson, and Hube 2013). Während *C. albicans* sowohl immunkompetente als auch immungeschwächte Individuen infizieren kann, sind diese Infektionen in der letzteren Gruppe, wie AIDS-Patienten, Patienten, die sich einer Krebs-Chemotherapie oder Immunsuppressionstherapie unterziehen, und Individuen mit implantierten medizinischen Material besonders ernst (Gulati and Nobile 2016). *C. albicans* ist eine der Hauptursachen für klinische Infektionen und umfasst zirka 15 % aller Sepsis-Fälle und 40 % der Blutkreislauf-Infektionen in klinischen Einrichtungen (Dorsaz, Coste, and Sanglard 2017).

Verschiedene Virulenzfaktoren dieses Pilzes begünstigen seine hohe Anpassungsfähigkeit und sein pathogenes Potenzial (Mayer, Wilson, and Hube 2013). Eine der Hauptvirulenz-Determinanten von *C. albicans* ist die Fähigkeit, von der Hefe in die Hyphenform überzugehen, wobei letztere sowohl adhäsiver als auch invasiver ist. Abb. 1 verdeutlicht die hyphale Invasion pathogener Pilzzellen in den Blutkreislauf.

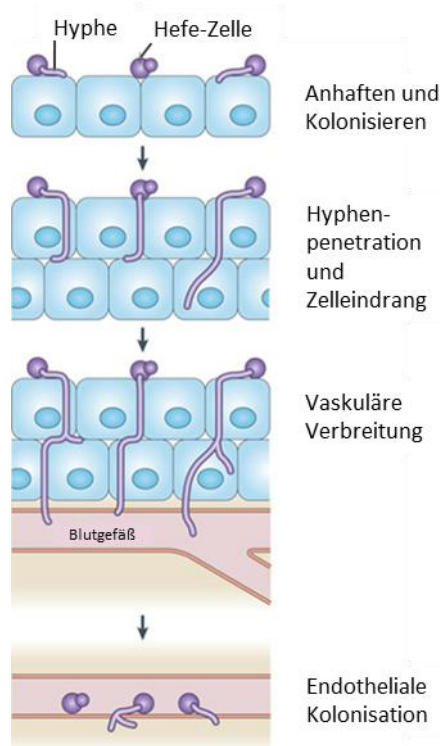


Abb. 1: Hyphale Infektion eines Organismus durch pathogene Hefepilze.

Pilzzellen adhären zunächst an Epithelien. Durch hyphales Wachstum sind Pilzzellen in der Lage die Hautschichten zu durchdringen und so den Blutkreislauf des Organismus zu infizieren (modifiziert nach Gow u. a. 2011). Die Regulierung von Hefen zu Hyphen-Übergang in diesem Pilz wird durch eine Vielzahl von wirtsrelevanten Signalen, einschließlich neutralem oder leicht alkalischem pH-Wert, gesteuert.

C. albicans ist, unter Nutzung von Aminosäuren als Kohlenstoffquelle, in der Lage den Umgebungs-pH-Wert zu erhöhen, indem Ammonium als Nebenprodukt metabolisiert und freigesetzt wird. Dabei steigt der pH-Wert von 4 auf zirka 7 (Vylkova et al. 2011). Für diese metabolischen Reaktionen wird ein SPS-Plasmamembran-Aminosäuresensor aktiviert und mobilisiert dabei den Transkriptionsfaktor Stp2, welcher die Expression von Aminosäurepermeasen und eine Familie von mutmaßlichen Ammoniaktransportern kontrolliert und damit für die Neutralisierung von sauren Umgebungen erforderlich ist (Vylkova and Lorenz 2017). Ein weiterer Transkriptionsfaktor, welcher einen ähnlichen Effekt der Alkalisierung und des Wachstums auf Aminosäure-haltigen Nährböden aufweist, ist Ahr1. Der Transkriptionsfaktor Ahr1 bildet mit dem Transkriptionsregulon Mcm1 einen Komplex, der am Aminosäurestoffwechsel des Erregers beteiligt ist (Askew et al. 2011). In Verbindung mit der Erhöhung des Umgebungs-pH-Wertes wird ein Wechsel des

Hefen-Wachstums zur Hyphen-Form induziert, welche zu einer erhöhten Pathogenität führt. Mutanten, welche einen Defekt der beiden Transkriptionsfaktoren aufweisen, wären möglicherweise nicht in der Lage den pH-Wert der Umgebung zu neutralisieren und könnten auf eine geringere Virulenz schließen lassen. Der Metabolismus von nicht bevorzugten Kohlenstoffquellen, wie beispielsweise Amin-haltigen Stoffen, ist ebenso essentiell für die Neutralisierung des Phagosoms und ein Prozess, der zum Wachstum von Hyphen und zum Entkommen aus den Phagozyten beiträgt (Vylkova and Lorenz 2017). Zusammenfassend zeigt dies, dass *C. albicans* durch Wachstum auf wirtsrelevanten Kohlenstoffquellen aktiv den pH-Wert der Umgebung anpasst, um seine eigene Virulenz zu fördern.

1.3 *Candida albicans* als Biofilm-Bildner

Eine weitere virulente Eigenschaft von *C. albicans*, die für menschliche Infektionen besonders kritisch ist, ist die Bildung eines Biofilms (Hirota et al. 2017). Der Biofilm, ein Gemenge aus Hefen- und Hyphenzellen ist mit einer Dicke von 25 µm bis zu 450 µm, einer festen Oberfläche und einer extrazellulären Matrix, einer der wichtigsten Resistenzmechanismen von *C. albicans*. Dieser bietet besonderen Schutz gegenüber Antimykotika im Vergleich zu einzelnen *Candida*-Kolonien (Chandra et al. 2001), (Hirota et al. 2017). Durch das im Biofilm selbst geschaffene Mikroklima und der verschiedenen Gas- und Nährstoffgradienten ist der *Candida*-Biofilm lange überlebensfähig und kann beim menschlichen Organismus mit zunehmender Dichte zu einer erhöhten Infektiosität führen.

1.4 Brandwundeninfektionen durch *Candida albicans*

Eine intakte menschliche Hautoberfläche ist entscheidend für die Erhaltung der Körperflüssigkeiten-Homöostase, Thermoregulation und den Schutz des Wirtes gegen Infektionen (McManus et al. 1981). Außerdem stellt die Haut die erste natürliche Barriere mit antimikrobiellen Faktoren gegen Mikroorganismen dar. Brandverletzungen der Hautoberfläche verursachen einen Riss und führen zur Veränderung des Mikroklimas an der Oberfläche (Coolen et al. 2008). Abb. 2 zeigt eine schematische Darstellung der Hautschichten im Verhältnis zur Tiefe von Brandverletzungen. Die Haut leitet sich von Ektoderm und Mesoderm ab und besteht im Wesentlichen aus drei anatomischen Schichten.

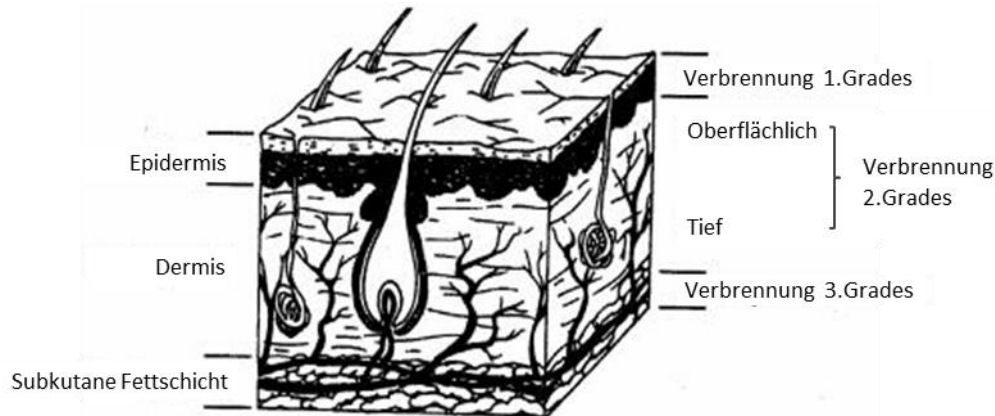


Abb. 2: Dreidimensionale Darstellung der Haut und ihrer Bestandteile.

Neben der Einteilung der Haut in Epidermis, Dermis und subkutanen Fettgewebe werden die drei Verbrennungsgrade anhand ihrer Tiefe im Gewebe dargestellt (Church et al. 2006).

Für eine optimale Wundheilung ist zunächst ein neutraler und später ein saurer pH-Wert sehr wichtig, sowie weitere Faktoren, die den pH-Wert beeinflussen (Gethin 2007). Das Messen des Oberflächen-pH-Wertes liefert eine Methode zur Überwachung des Zustandes des Wundbettes und spielt letztlich bei der Wundbehandlung eine wichtige Rolle (Gethin 2007). So stellen akute als auch chronische und vor allem tiefere Brandwunden (ab 2.Grades) weiterhin eine Behandlungsherausforderung für den Mediziner dar.

Verbrennungen können bei Patienten ein schweres Trauma auslösen und benötigen eine sofortige Spezialbehandlung, um den Krankheitszustand zu verbessern (Church et al. 2006). Bei ausgedehnten Brandwunden werden die Phagozyten in ihren chemischen und phagozytischen Abwehrmechanismen unwirksam gemacht und verhindern so die Freisetzung von Cytokin, welches zur Immunabwehr beitragen würde. Dabei kommt es meist in der zweiten Woche der thermischen Schädigung zu einer Infektion mit *Candida*-Erregern aus der Umgebung oder mit den körpereigenen *C. albicans*-Stämmen aus dem Magen-Darm-Trakt, welche durch die körpereigene Immunabwehr zunächst von den Phagozyten attackiert werden (Church et al. 2006). In der frühen Phase der Phagozytose verschieben sich die Hefe-Zellen in einen Hungermodus, einschließlich eines gluconeogenen Wachstums, einer Aktivierung des Fettsäureabbaus und einer Herabregulierung der Translation. In einer späteren Phase, wenn das Hyphenwachstum das Entweichen von *C. albicans* aus dem Makrophagen ermöglicht, nehmen die Zellen das glykolytische Wachstum wieder auf. Darüber hinaus gibt es in der frühen Phase eine substanzielle nichtmetabolische Reaktion, die eine

DNA-Reparatur, oxidative Stressreaktionen, Peptid-Aufnahmesysteme und Arginin-Biosynthese umfasst. Nach der Überwindung der Phagozyten (in Abschnitt 1.2 beschrieben) und der Kolonialisierung der Wunde beginnt *C. albicans* mit dem Aufbau eines Biofilms, welches den Wundheilungsprozess deutlich verlangsamt (Kumamoto 2002). Durch den Schutz der extrazellulären Matrix und der antimykotischen Resistenzen von *C. albicans*, einhergehend mit Immunschwächen im Patienten, wird eine ärztliche Behandlung zusätzlich erschwert. Daten des Nationalen Zentrums für Verletzungsprävention und -kontrolle in den Vereinigten Staaten zeigen, dass jedes Jahr ungefähr 2 Millionen Feuer gemeldet werden, was 1,2 Millionen Menschen mit Brandverletzungen zur Folge hat (Gethin 2007). Bei Patienten mit schweren Verbrennungen über mehr als 40 % der gesamten Körperoberfläche, welches einen kleinen Teil der 1,2 Millionen Verbrennungsoffer betrifft, sind derzeit 75 % aller Todesfälle mit einer Sepsis durch starke Candidose oder anderen Verbrennungs- und Infektionskomplikationen verbunden (Huebinger et al. 2016). Derzeit ist jedoch der Infektionsverlauf sowie die Reaktion des Wirtes von *C. albicans* in Brandwundeninfektionen noch nicht vollständig entschlüsselt und bedarf weiterer Forschung.

1.5 Analyse des Infektionsverlaufs im Tiermodell mittels Lumineszenz

Die in Abschnitt 1.2 genannte Hypothese, dass *stp2Δ*- und *ahr1Δstp2Δ*-Deletionsmutanten in Brandwundeninfektionen weniger virulent sein könnten, bleibt zu beweisen. Für deren Untersuchung sind Tiermodelle nötig. Um den Verlauf von Infektionen mit *C. albicans* im Tiermodell nicht-invasiv zu untersuchen, können Isolate stabil mit einem Codon-optimierten Luciferase-Gen transformiert werden, welches für eine konstitutive Luciferase-Expression nötig ist (Doyle et al. 2006). Dabei wird D-Luciferin zum Organismus gegeben und von der exprimierten Luciferase unter Anwesenheit von ATP, Magnesium und Sauerstoff zu Oxyluciferin, Pyrophosphat, AMP und Kohlenstoffdioxid abgebaut (Abb. 3). Das bei dieser Reaktion emittierte Lichtsignal kann bei zirka 560 nm gemessen werden (Dorsaz, Coste, and Sanglard 2017).

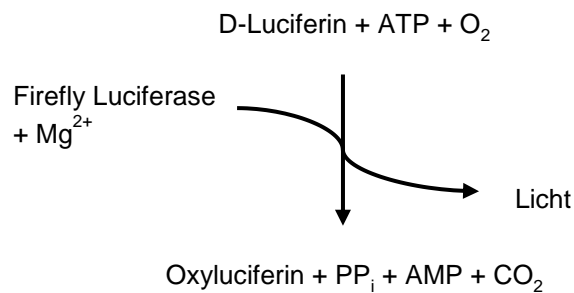


Abb. 3: Funktionsprinzip der Firefly Luciferase.

Zugegebenes D-Luciferin wird von der Firefly-Luciferase unter Verbrauch von ATP, Magnesium und Sauerstoff zu Oxyluciferin, Pyrophosphat, AMP und Kohlenstoffdioxid verstoffwechselt und sendet dabei ein messbares Lichtsignal mit einer Wellenlänge von zirka 560 nm aus (Dorsaz, Coste, and Sanglard 2017).

Diese Methode ermöglicht es Infektionen in Echtzeit zu analysieren und mögliche neue zeitliche oder räumliche Verläufe von Infektionen aufzudecken (Jacobsen et al. 2014). Tierstudien mit Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämmen können somit zu einem besseren Verständnis der Pilzvirulenz führen und zur Analyse der Wirksamkeit antifungaler Substanzen verwendet werden (Dorsaz, Coste, and Sanglard 2017).

2 Zielstellung

Ziel dieser Bachelorarbeit ist die Herstellung, Evaluierung und *in vitro*-Charakterisierung Luciferase-exprimierender *Candida albicans*-Stämme. Diese Stämme sollen in einem späteren Brandwundeninfektionsmodell an Ratten eingesetzt werden, um den Infektionsverlauf nach Applikation von *Candida albicans in vivo* zu untersuchen. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der allgemeinen Pathogenese des Pilzes und zur Identifizierung möglicher Virulenzfaktoren führen.

Die folgenden Punkte sind dabei wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Bachelorarbeit:

- 1) Transformation der Transformationskassette pADH1:*luc*(opt) in die beiden Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ*.
- 2) Evaluierung der Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämme durch Analyse des Biolumineszenz-Signales.
- 3) Charakterisierung der Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämme durch Untersuchung von:
 - a) Wachstum
 - b) pH-Wert
 - c) Filamentierung
 - d) Morphologiein verschiedenen Medien und Vergleich mit entsprechenden Kontrollstämmen.
- 4) Analyse des Einflusses der beiden Transkriptionsfaktoren *stp2Δ* und *ahr1Δ* auf Wachstum, pH-Wert, Filamentierung und Morphologie.

Die Charakterisierung der Luciferase-exprimierenden Stämme wurde durchgeführt, um zu untersuchen, ob die Expression der Luciferase einen Einfluss auf die oben genannten Parameter nimmt und damit im Tiermodell möglicherweise den Infektionsverlauf beeinflussen könnte.

3 Material

3.1 Software

Tab. 1: Software

Programm	Verwendung
AlphaInnotech Version 3.0.3.0	Geldokumentation
ApE Clone Manager	Sequenzanalysen
AxioVision Rel. 4.8	Analyse und Bildaufnahmen der Morphologie
Gen 3.02	Bioteck Cytation 5
GraphPad Prism 7	Datenanalyse und statistische Auswertung
ZEN 2.3	Bildaufnahme der Filamentierungsversuche

3.2 Verwendete *Candida albicans*-Stämme

Tab. 2: Liste der verwendeten *C. albicans*-Stämme

Stamm	Hintergrund	Genotyp	Referenz
CAI4	CAI4	pACT1: <i>luc</i> (opt)	Prof. Dr. Ilse Denise Jacobsen
SC5314	SC5314	Wildtyp	Dr. Slavena Vylkova
SC5314	SC5314	pADH1: <i>luc</i> (opt)	Dr. Christin Leitzinger
pADH1: <i>luc</i> (opt)			
<i>stp2</i> Δ	SC5314	<i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i>	Dr. Slavena Vylkova
<i>stp2</i> Δ	SC5314	<i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i>	Diese Arbeit
pADH1: <i>luc</i> (opt)		<i>FTR</i> -pADH1: <i>luc</i> (opt)	
<i>ahr1</i> Δ <i>stp2</i> Δ	SC5314	<i>ahr1</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>ahr1</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i>	Dr. Slavena Vylkova
<i>ahr1</i> Δ <i>stp2</i> Δ	SC5314	<i>ahr1</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>ahr1</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i>	Diese Arbeit
pADH1: <i>luc</i> (opt)		<i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> / <i>stp2</i> Δ:: <i>FTR</i> -pADH1: <i>luc</i> (opt)	

3.3 Oligonukleotide

Tab. 3: Liste der verwendeten Oligonukleotide

#	Primer-Bezeichnung	Konzentration [pmol/μl]	Schmelztemperatur T _m [°C]	Sequenz
566	G1-ADH1	100	53,8	TATCCGGAAGCTGGTAGCG
762	CaACT1term	100	57,5	GAATACAAAACCAGATTTCCA
	veri rev			GATTTCCAG
1090	STP2 veri	100	53,7	CCATCTTAAACTGCGTCATTT
				CAATTA
1092	R2 STP2	100	52,4	TTGTTGCTGTTGACCAGGTTG
1152	Clo_veri_fw	100	53,8	ACTTCTCACTTGCCACCAGG
1153	Clo_veri_rv	100	53,8	AGACAATGGAGCACCACCAG
1154	Clo_veri_rv5'	100	51,8	CAATGGGTAGAATGGAGCTG

3.4 Plasmide und Enzyme

Das von Dr. Matthias Brock zur Verfügung gestellte pUC-Plasmid mit *C. albicans*-optimierter Luciferase (unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors mit Homologieregion für die Integration in den *RP10* Locus (Abb. 4, Jacobsen et al. 2014) wurde von Dr. Christin Leitzinger mittels PCR amplifiziert. Dabei wurden Restriktionsschnittstellen für *XhoI* und *EcoRI* eingebracht. Nach Aufreinigung und Restriktion des PCR-Produktes mit diesen beiden Enzymen erfolgte die Ligation in das in Abb. 5 gezeigte Plasmid. Die Transformationskassette wurde über die beiden Restriktionsenzyme *NarI* und *SacI* (New England Biolabs) ausgeschnitten und in die beiden Mutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* transformiert.

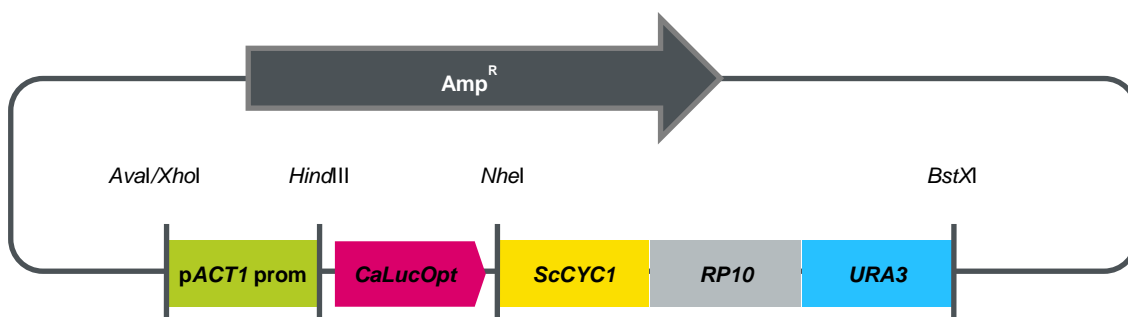


Abb. 4: pUC-Plasmid mit *Candida albicans*-optimierter Luciferase unter Kontrolle des *ACT1*-Promotors und *URA3* als Selektionsmarker.

Mittels PCR wurde das Luciferase-Gen amplifiziert und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *XhoI* und *EcoRI* integriert. Die Transformationskassette ist Bestandteil des CAI4-biolumineszenten Wildtypstammes, der von Prof. Dr. Ilse Denise Jacobsen zur Verfügung gestellt wurde.

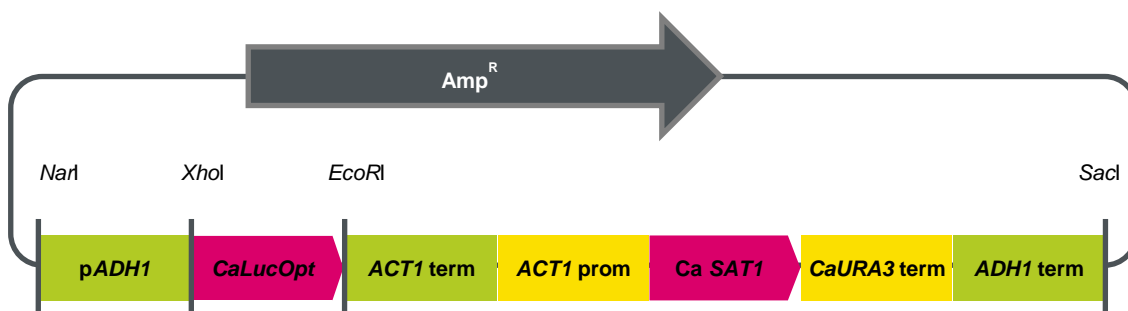


Abb. 5: Plasmid mit *Candida albicans*-optimierter Luciferase unter Kontrolle des *ADH1*-Promotors und *SAT1* als Selektionsmarker.

Die mit *NarI* und *SacI* geschnittene Transformationskassette wurde über die *ADH1*-Homologieregion in den Wildtyp SC5314, *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* transformiert.

3.5 Medien

Tab. 4: Liste der verwendeten Flüssig- und Festmedien

Medium	Zusammensetzung	Aggregatzustand	pH-Wert
YPD Medium	1 % Hefeextrakt 2 % Pepton 2 % D-Glukose	flüssig	6,7; 4,0
YNB+AmSu+2 % Glc	0,17 % YNB 0,5 % AmSu 2 % Glukose		7,0; 4,0
YNB+AmSu+1 % CAA (Alkalinisierungsmedium)	0,17 % YNB 0,5 % AmSu 1 % CAA		4,0
RPMI 1640 Medium + 10 % FBS	2,0 g/L NaHCO ₃ mit stabilem Glutamin low endotoxine 10 % FBS		7,0
Spidermedium	10 g Hefeextrakt 10 g Mannitol 2 g K ₂ PO ₄ 13,5 g Agar	fest	7,2
YPD + ClonNat	1 % Hefeextrakt 2 % Pepton 2 % D-Glukose + 250 µg/ml ClonNat		4,0

3.6 Chemikalien

Tab. 5: Liste der verwendeten Chemikalien

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
TopVision Agarose Tabletten	R2801	Thermo Scientific
Rotiphoress® 50x TAE Puffer	CL86.2	Roth GmbH
EtBr (10 mg/mL in H ₂ O)	E1510	Sigma-Aldrich
Deionisiertes Wasser	MN1035	Ampuwa
4 % Roti-Histofix	P087.1	Roth GmbH

3.7 Puffer und Lösungen

Tab. 6: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
1 % Agarose-Gel	1 % Agarose-Gel (400 ml Ansatz): 8x 0,5 g Tabletten in 400 ml H ₂ O
1x TAE Puffer	<u>2 l</u> : 40 ml 50x TAE Puffer in 1960 ml H ₂ O
EtBr-Bad	150 µl EtBr in 1500 ml H ₂ O
TE-Puffer	<u>10x TE</u> : 100 ml 1 M Tris-Cl, 20 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 880 ml ddH ₂ O <u>Für 1x TE</u> : 10 ml 1 M Tris-Cl, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 988 ml ddH ₂ O
PEG-Lösung	500 µl 1 M LiAc, 500 µl 10x TE, 4 ml 50 % PEG
LiAc-Lösung	300 µl 1 M LiAc, 300 µl 10x TE, 2400 µl H ₂ O

3.8 Kits

Tab. 7: Liste der verwendeten Kits und DNA Fragmente

Bezeichnung	Katalognummer	Hersteller
6x Orange DNA Loading Dye	R0631	Thermo Scientific
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	SM0311	Thermo Scientific
QIAquick Gel Extraction Kit	28704	QIAGEN N.V.
ssDNA (gescherte Salmon Sperm DNA)	AM9680	Thermo Scientific
YeaStar Genomic DNA Kit	D2002	YeaStar

3.9 Verbrauchsmaterialien

Tab. 8: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
PARAFILM	Abdichten der Petrischalen	A. Hartenstein
Reaktionsgefäß mit Deckel, PP, graduert (1,5 ml; 2,0 ml)	verschiedenes	A. Hartenstein
Corning® 50 mL PP Zentrifugen-Tubes	verschiedenes	Corning®
Costar® Stripette® Pipetten (10–50 ml)	Resuspension, Animpfen	Corning®
Pipettenspitzen ohne Filter (0,5–1000 µl)	Pipettieren	TipOne
Pipettenspitzen mit Filter (0,5–1000 µl)	Pipettieren	TipOne
96-Well Zellkulturplatte mit Deckel, transparent	Wachstumsmessung	Corning®
96-Well Zellkulturplatte mit Deckel, weiß	Biolumineszenzmessung	Corning®

3.10 Hilfsmittel

Tab. 9: Liste der verwendeten Hilfsmittel

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Research Plus, variable Kolbenhubpipetten (0,5–1000 µl)	Pipettieren	Eppendorf
LHP-PH 01	Pipettierhilfe	Phoenix
Zählkammer, 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	Zellzahlbestimmung	Neubauer

3.11 Geräte

Tab. 10: Liste der verwendeten Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Agarose-Gelelektrophorese	The Multimage® I	Alpha Immotec
	Alphamager EP (UV-Kabinett)	
	PowerPac HC	BIO-RAD
	250 V/3,0 A/300 W (Spannungsgeber)	
Inkubatoren	Mini Horizontal Gel Unit (Gelkammer)	Biostep
	Aqualine AL 5 (Wasserbad)	LAUDA
	Schüttelinkubator Multitron (30 °C; 37 °C)	Infors HT
	HeraTherm (30 °C; 37 °C)	Thermo Scientific
Mikroskope	Observer Z1 (inversive Mikroskopieplattform)	Zeiss
	Axiostar Plus (Durchlichtmikroskop)	Zeiss

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikrotiterplattenmessgerät Schüttler	Sterni 2000-C	Zeiss
	AxioCam ICc3	
	HT 50	
	Cytation 5 Imaging-Reader	Biotek
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries
Spektrometer Werkbank Zentrifugen	T3000 Thermocycler	Biometra
	Thermomixer comfort	Eppendorf
	Genesys 10UV Spektrophotometer	Thermo Scientific
	Maxisafe 2020	Thermo Scientific
	Centrifuge 5424	Eppendorf
	Combi-Spin FVC-2400N	Peqlab
	Multifuge X3R	Thermo Scientific

4 Methoden

4.1 Molekularbiologische Methoden zur Herstellung biolumineszenter *Candida albicans*-Stämme

Brandwunden sind hochempfindliche Bereiche für Infektionen mit Bakterien und Pilzen, die in einer Sepsis resultieren können. Systemische Candidosen in Folge von Verbrennungswunden haben mit bis zu 70 % eine hohe Mortalitätsrate (Tsui, Kong, and Jabra-rizk 2016). Mithilfe Luciferase-exprimierender *Candida*-Stämme kann der Verlauf einer Infektion im Rattenmodell über die Messung des Lumineszenzsignales verfolgt werden. Das Luciferase-Gen wurde vom Plasmid pACT1:*luc*(opt) (Abb. 4) mittels PCR amplifiziert und in das Plasmid #138 (Abb. 5) transformiert. Anschließend wurde die Transformationskassette mit dem Luciferase-Gen vom Plasmid pADH1:*luc*(opt) in den *C. albicans*-Wildtyp SC5314 transformiert und verifiziert. Der *C. albicans*-Wildtyp SC5314 pADH1:*luc*(opt) wurde bereits erfolgreich von Dr. Christin Leitzinger hergestellt. Der nächste Schritt war, die Transformationskassette aus dem Plasmid pADH1:*luc*(opt) mithilfe von Restriktionsenzymen erneut auszuschneiden, in die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* zu transformieren und positive Klone zu verifizieren.

4.1.1 Restriktion des Luciferase-enthaltenden Plasmids pADH1:*luc*(opt) zur Klonierung in die *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* Deletionsmutanten

Zur Herstellung der biolumineszenten Stämme *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* wurde das in Abb. 5 gezeigte Plasmid mit den Restriktionsenzymen *NarI* und *SacI* wie folgt geschnitten: 20 µl Plasmid, 5 µl NEB 4-Puffer, 5 µl 10X BSA und je 20 Units der beiden Restriktionsenzyme (4 µl *NarI* und 1 µl *SacI*) wurden mit DNase-freiem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 50 µl aufgefüllt und anschließend für drei Stunden bei 37 °C im Thermocycler inkubiert. Die abschließende Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme erfolgte für 20 min bei 65 °C.

4.1.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Verifizierung von geschnittenen Plasmiden und PCR-Produkten erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1 %-igen Agarose-Gel in 1X TAE-Puffer bei 100–130 V. Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel wurden diese mit „6X Orange DNA Loading Dye“ (New England Biolabs, Frankfurt am Main) versetzt. Als Größenmarker wurde der „O’Gene Ruler 1 kB DNA Ladder“ von Fermentas verwendet.

Nach elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel für 30 min in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml, Sigma Aldrich, Taufkirchen) gefärbt, kurz mit Wasser gewaschen und die DNA-Banden unter UV-Licht (AlphaImager EP/Multimage I, Genetic Technologies Inc., Miami FL; USA) visualisiert. Die gewünschte Bande wurde für die nachfolgende Gelextraktion mit einem Skalpel ausgeschnitten.

4.1.3 Gelaufreinigung mittels QIAquick Gel Extraktion Kit

Die Gelextraktion wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit von QIAGEN N.V. entsprechend der Herstellerangaben mit folgenden Modifikationen durchgeführt: Die ausgeschnittenen Gelbanden wurden mit 900 µl QG-Puffer versetzt und für zehn Minuten bei 50 °C im Heizblock erwärmt. Zwischendurch wurden die Proben gemischt, um ein vollständiges Lösen des Gels zu erreichen. Jede der Proben wurde mit 300 µl Isopropanol versetzt, um die in der Lösung enthaltene DNA zu fällen. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte mit 50 µl Nuclease-freiem Wasser. Die Kontrolle der DNA-Aufreinigung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

4.1.5 Transformation

Die Transformation des Luciferase-Gens in *C. albicans* erfolgte mittels der Lithium-Acetat-Methode (Walther and Wendland 2003). Die ÜN-Kulturen von *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* wurden 1:100 verdünnt (500 µl Kultur + 50 ml YPD), für weitere vier Stunden bei 30 °C und 180 rpm inkubiert und anschließend in ein 50 ml-Reaktionsgefäß überführt. Das Pelletieren der Zellen erfolgte durch zehnminütige Zentrifugation bei 4000 x g. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Pellets in 50 ml Wasser resuspendiert, erneut abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Pellets in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert, für eine Minute zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Pellets wurden in 1 ml LiAc-Lösung (300 µl 1 M LiAc, 300 µl 10x TE, 2400 µl H₂O) resuspendiert. Pro Transformations-Ansatz wurden 100 µl der Zellsuspension mit 10 µl ssDNA (gescherte Salmon Sperm DNA, für zehn Minuten bei 95 °C erhitzt, danach auf Eis gelagert) gemischt. Diese DNA wird als Anker verwendet, um die Transformationskassette in die Zellen zu transportieren. Nach zwei bis drei Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden je 20 µl der Transformationskassette (Luciferase-Gen) zum Transformations-Ansatz hinzugegeben, für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und mit jeweils 600 µl PEG-Lösung (500 µl 1 M LiAc, 500 µl 10x TE, 4 ml 50 % PEG) versetzt. Anschließend wurden die Proben für 30 sec gemischt und für 16–18 Stunden bei 30 °C und 800 rpm geschüttelt. Die Transformation wurde mittels Hitzeschock für 15 min bei

44 °C und 800 rpm beendet und die Zellen für 1 min auf Eis äquilibriert. Die Zellen wurden bei 16000 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1 ml YPD resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 9 ml Flüssig-YPD-Medium überführt, für vier Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert, anschließend abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde im restlichen YPD resuspendiert, auf YPD-Agarplatten mit 200 µg/ml Nourseothricin (ClonNat) ausplattiert und die Platten für zwei Tage bei 30 °C inkubiert.

4.1.6 Kolonie-Polymerasekettenreaktion

Für die Kolonie-PCR wurde eine kleine Zellmenge in 10,5 µl DNase-freiem Wasser resuspendiert, für zwei Minuten bei 95 °C erhitzt und anschließend mit 14,5 µl Master Mix (1 µl Vorwärtsprimer, 1 µl Rückwärtsprimer, 12,5 µl Q5 High-Fidelity Master Mix), versetzt. Folgende Kombinationen (Tab. 11) mit den entsprechenden Temperaturen zur Primerbindung und Zeiten zur Elongation wurden verwendet:

Tab. 11: Übersicht über die Primerkombinationen der Kolonie-PCR

t [min]	δ [°C]	Bemerkung	1	2	3
4	95				
		40x			
1	95	Denaturierung			
1	x	Primerbindung	52,8 °C	53,8 °C	55,7 °C
x	72	Elongation [min]	2:30	1:00	2:30
10	72				
Var	4				
		Nr. Primer vorwärts	566	1152	1152
		Nr. Primer rückwärts	1154	1153	762
		Primerbindungsstelle	5'-Ende	intern	3'-Ende
		Fragment-Länge	1174 bp	456 bp	1195 bp

4.2 Mikrobiologische Evaluierung der biolumineszenten *Candida albicans*-Stämme

4.2.1 Kultivierung der *Candida albicans*-Stämme

Für ÜN-Kulturen wurden Zellen von den Agarplatten gesammelt, in Erlenmeyerkolben mit 10 ml YPD pH 4,0 Flüssigmedium überführt und über Nacht bei 30 °C und 180 rpm inkubiert. Die ÜN-Kulturen wurden in 50 ml Schraubkappengefäße überführt, die Zellen durch fünfminütige Zentrifugation bei 4000 x g und RT pelletiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Pellets in jeweils 10 ml sterilem Wasser

resuspendiert, durch erneute Zentrifugation gewaschen und das Zellpellet in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert.

4.2.2 Nachweis der Biolumineszenz

Luciferase-exprimierende *C. albicans*-Stämme sind in der Lage D-Luciferin mit Hilfe der Luciferase, Sauerstoff und ATP zu Oxyluciferin unter Abbau von ATP umzuwandeln. Dabei wird ein Lichtsignal freigesetzt, welches in einem Lumineszenzmessgerät detektiert und gemessen werden kann.

Nach Sammeln und waschen der Zellen wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, wurde die optische Dichte bei 600 nm in YPD-Flüssigmedium pH 4,0 (10 µl Kultur + 990 µl YPD pH 4,0) gemessen. Die Zelldichte wurde auf eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 0,2 in 10 ml YPD-Flüssigmedium pH 4,0 eingestellt (berechnet nach der Formel $c_1 \times V_1 = c_2 \times V_2$). Nach erneuter Inkubation für vier Stunden bei 37 °C und 180 rpm wurden die Zellen wie in Abschnitt 4.2.1 gesammelt und die Zelldichte auf eine optische Dichte bei 600 nm von 1,0 verdünnt. Von einer 1:100-Verdünnung in Wasser wurde die Zellzahl mittels Neubauer-Zählkammer mikroskopisch bestimmt und anschließend auf 5×10^7 Zellen/ml eingestellt. In eine weiße 96-Wellplatte wurde 195 µl YPD-Flüssigmedium pH 6,7 pipettiert und mit 10 µl der eingestellten Kultur angeimpft. Danach wurde zu jedem Well 1,6 µl D-Luciferin hinzugegeben, der Deckel verschlossen und im Biotek Cytation 5 das Lumineszenzsignal über 24 Stunden alle 30 min gemessen.

4.2.3 Wachstumskurven

Nach Sammeln und waschen der Zellen wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, wurde für die Wachstumsmessung eine $OD_{600\text{ nm}}$ von 4,0 in Wasser eingestellt. Fünf Mikroliter dieser Zellsuspension (bzw. Wasser als Negativkontrolle) wurden in Triplikaten in 195 µl verschiedener Medien (YPD pH ~ 6,7 bzw. 4,0; YNB+AmSu+Glc pH 7,0 bzw. 4,0; YNB+AmSu+CAA pH 4,0 [nur für anschließende pH-Messung]) verdünnt, sodass sich eine Start-OD von 0,2 ergibt. Um ein Austrocknen der Kulturen zu vermeiden, wurden in die Randvertiefungen jeweils 200 µl und in die Zwischenräume 75 µl steriles Wasser pipettiert. Die Messung des Wachstums erfolgte bei 37 °C über die optische Dichte bei 600 nm für 24 Stunden alle 30 min. Dabei wurde die Platte vor jeder Messung für 30 sec bei 180 rpm doppelt orbital geschüttelt.

4.2.4 pH-Wert Messung

Nach Abschluss der Wachstumsmessung wurde in jeder Vertiefung der pH-Wert mittels einer kalibrierten Glas-Mikroelektrode (Thermo Fisher, Orion 8220 BNWP) gemessen.

4.2.5 Filamentierung

Für die Analyse der Hypheninduktion wurden zur Messung der OD_{600 nm} 10 µl der gesammelten und gewaschenen Zellen in einer Küvette mit 990 µl RPMI+10 % FBS bzw. YNB+CAA gemischt und eine OD_{600 nm} von 0,1 im jeweiligen Medium eingestellt. Die Reaktionsgefäße wurden mit Parafilm abgedichtet und für vier Stunden bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Proben wurden anschließend für eine Minute abzentrifugiert, einmal mit Wasser gewaschen und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden in 25 µl sterilem Wasser und 25 µl HistoFix (Roth) resuspendiert und über Nacht bei 4 °C fixiert. Die Zellmorphologie wurde mit Hilfe des Zeiss Observer Z1 mikroskopisch analysiert. Pro Bedingung wurden mindestens 50 Zellen ihrer entsprechenden Kategorie (Hefe, Germ Tube oder Hyphe) zugeordnet.

4.2.6 Morphologie

Für die Untersuchung der Morphologie wurde von den gesammelten und gewaschenen Zellen der ÜN-Kultur eine OD_{600 nm} von 0,2 in Wasser eingestellt. Je 5 µl der hergestellten Kultur wurden auf Spideragar (pH 7,2) pipettiert. Nachdem die Kultur auf dem Medium getrocknet war, wurden die Platten kopfüber bei 30 °C und 37 °C für 48 Stunden inkubiert. Anschließend wurde die Morphologie mittels eines Binokulars (Zeiss, Stemi 2000-C) analysiert.

4.3 Statistik

In dieser Arbeit entspricht „N“ der Anzahl der biologischen Replikate und „n“ der Anzahl der technischen Replikate. Die Daten sind als Box-Plot mit Median, Minimum und Maximum (Lumineszenz) bzw. Mittelwert ± Standardabweichung (pH-Wert) dargestellt. Waren mehr als vier technische Replikate verfügbar, wurde der Grubbs Ausreißertest (ESD Methode, extreme studentized deviate) mit einem Signifikanzlevel von $\alpha = 0.05$ durchgeführt. Zum Vergleich von drei oder mehr Gruppen wurde die statistische Signifikanz mittels einseitiger ANOVA mit Tukey's multiplen Vergleichstest (GraphPad Prism 7) überprüft. In dieser Studie sind die statistisch signifikanten p-Werte wie folgt definiert: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001.

5 Ergebnisse

5.1 Herstellung Luciferase-exprimierender *C. albicans*-Stämme

Für die Herstellung Luciferase-exprimierender *C. albicans*-Stämme musste zunächst die Transformationskassette aus dem Plasmid #138 (Abb. 5) mithilfe der Restriktionsenzyme *NarI* und *SacI* ausgeschnitten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt werden (Abb. 6A). Die Restriktion ergab Fragmentgrößen von 2867 bp für das Rückgrat und 5028 bp für die gewünschte Transformationskassette mit dem Luciferase-Gen. Ein kleiner Anteil des Plasmids blieb ungeschnitten, sodass bei ca. 7900 bp ebenfalls ein Fragment sichtbar ist. Die in Abb. 6A markierten Fragmente wurden anschließend ausgeschnitten und aufgereinigt und die Aufreinigung mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Die in Abb. 6B bei ca. 5028 bp befindlichen Banden bestätigen die erfolgreiche Gelaufreinigung.

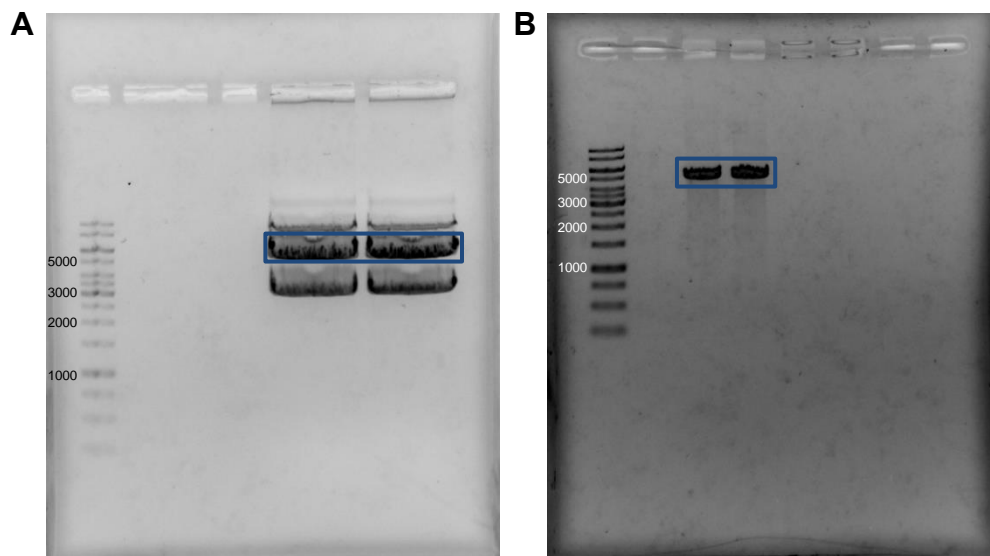


Abb. 6: Die gelelektrophoretische Auftrennung der Restriktion von Plasmid #138 mit *NarI* und *SacI* ergab Fragmente mit einer Größe von 2867 bp (Rückgrat) und 5028 bp (Transformationskassette).

- (A) Gelelektrophoretische Auftrennung nach Restriktion des Plasmids #138 mit den Enzymen *NarI* und *SacI*. Links ist die DNA-Leiter (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen, rechts das geschnittene Plasmid in Duplikaten. Das Plasmid-Rückgrat hat eine Größe von 2867 bp, die das Luciferase-Gen-enthaltende Transformationskassette (blau markiert) eine Größe von 5028 bp. Oberhalb ist noch eine geringe Menge vom nicht-geschnittenen Plasmid (7895 bp) zu sehen.
- (B) Überprüfung der Aufreinigung der Transformationskassette mittels Agarose-Gelelektrophorese. Links befindet sich die aufgetragene DNA-Leiter mit den Banden von 250–10000 bp. Rechts daneben sind zwei einzelne deutliche Banden von 5028 bp zu sehen, welche die erfolgreiche Gelaufreinigung bestätigen. N=1, n=2.

Um zu untersuchen, ob die Integration des Luciferase-Gens ins Genom am *ADH1*-Locus erfolgreich war, wurden jeweils vier Kolonien der transformierten *Candida albicans*-Stämme *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* mittels **Kolonie-PCR** und anschließender Gelelektrophorese verifiziert (Abb. 7). Dabei wurden drei verschiedene Primerkombinationen, die unterschiedliche Bereiche im Gen amplifizieren, verwendet. Primerkombination 1 amplifiziert den Übergang vom *ADH1*-Promotor zum 5'-Ende des Luciferase-Gens und ergibt eine Fragmentgröße von zirka 1200 bp. Sowohl für die *stp2Δ*- als auch die *ahr1Δstp2Δ*-Deletionsmutante sind bei drei der vier untersuchten Proben Banden bei etwa 1200 bp zu sehen. Auch beim Luciferase-exprimierenden Wildtyp ist eine – wenn auch schwache – Bande bei etwa 1200 bp zu finden. Primerkombination 2 (intern) amplifiziert ein etwa 450 bp langes Fragment im Luciferase-Gen. Sowohl beim Wildtyp als auch bei den untersuchten Kolonien der beiden Deletionsmutanten sind in allen Proben zirka 450 bp große Fragmente im Gelbild sichtbar. Primerkombination 3, welche zirka 1200 bp am Übergang vom Luciferase-Gen zum *ACT1*-Terminator amplifiziert, zeigt ebenfalls für alle untersuchten, Luciferase-exprimierenden Proben ein Fragment von 1200 bp. Die entsprechenden Kontrollstämme, die keine Luciferase exprimieren, sind für alle drei untersuchten Primerkombinationen negativ. Für die anschließende Charakterisierung wurden die Kolonien mit dem stärksten Signal ausgewählt: Kolonie 4 für *stp2Δ* und Kolonie 1 für *ahr1Δstp2Δ*.

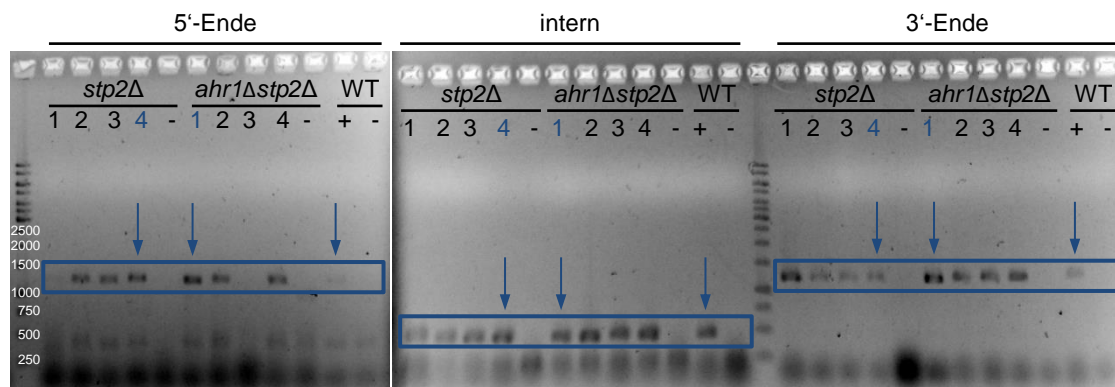


Abb. 7: Die Verifizierung der untersuchten Kolonien zeigt eine erfolgreiche Integration des Luciferase-Gens in den *ADH1*-Locus.

Gelelektrophoretische Auftrennung nach durchgeführter Kolonie-PCR. Links und in der Mitte ist die DNA-Leiter (O'GeneRuler 1 kb DNA Ladder, Fermentas) aufgetragen. Primerkombination 1 amplifiziert den Übergang vom *ADH1*-Promotor zum Luciferase-Gen und ergibt ein Fragment von etwa 1200 bp. Je drei der vier untersuchten Kolonien zeigen eine Bande. Primerkombination 2 amplifiziert einen etwa 450 bp langen Bereich im Luciferase-Gen, Primerkombination 3 den Übergang vom 3'-Ende des Luciferase-Gens zum *ACT1*-Promotor (etwa 1200 bp). Für beide Ansätze zeigen alle vier untersuchten Kolonien entsprechende Bandengrößen. Als Kontrollen wurde der Luciferase-exprimierende Wildtyp SC5314 und entsprechende Kontrollstämme ohne Luciferase-Expression mitgeführt.

5.2 Luciferase-exprimierende *C. albicans*-Stämme emittieren ein stärkeres Lichtsignal als ihre Kontrollstämme

Nach erfolgreicher Verifizierung der Kolonien mittels Kolonie-PCR sollte nun überprüft werden, ob die Luciferase exprimiert wird. Hierfür wurde die **Lumineszenz** der Luciferase-exprimierenden und der Kontrollstämme in YPD-Flüssigmedium nach Zugabe von D-Luciferin gemessen (Abb. 8). Zu Beginn der 24 Stunden-Messung (Abb. 8A) zeigt der von Prof. Dr. Ilse D. Jacobsen zur Verfügung gestellte CAI4 (+Luc)-Stamm ein Signal von 3950 Lumineszenzeinheiten. Für den Wildtyp SC5314 (+Luc) wurde ein Signal von 10000 Lumineszenzeinheiten und für die *stp2Δ* (+Luc)- bzw. *ahr1Δstp2Δ*-Deletionmutanten von jeweils 9000 bzw. 7800 Lumineszenzeinheiten gemessen. Alle Kontrollstämme, die keine Luciferase exprimieren, emittierten Lichtsignale bis maximal 25 Lumineszenzeinheiten. Nach Messung des initialen Lumineszenzsignales wurde auch der Verlauf über 24 Stunden gemessen. Bei allen Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämme sinkt das Lumineszenzsignal nach etwa zwei Stunden auf zirka 2000 Lumineszenzeinheiten, bei CAI4 auf unter 1000 Lumineszenzeinheiten. Nach etwa 12 Stunden ist bei allen Luciferase-exprimierenden Stämmen kein Signal mehr messbar. Die entsprechenden Kontrollstämme zeigen über die gesamte Dauer der Messung kein Lumineszenzsignal.

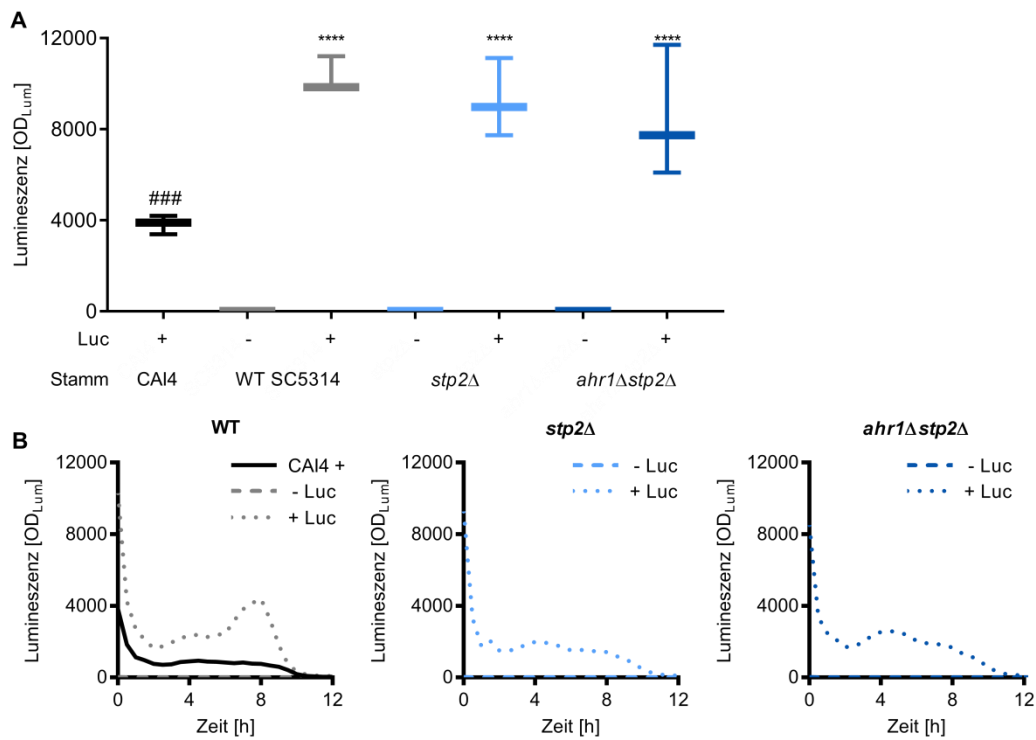


Abb. 8: Im Gegensatz zu den Kontrollstämmen emittieren Luciferase-exprimierende *Candida albicans*-Stämme ein starkes Lumineszenzsignal, welches aber über die Zeit abnimmt.

- (A) Luciferase-exprimierende *C. albicans*-Stämme emittieren ein bis zu 400-fach stärkeres Lumineszenzsignal als ihre Kontrollstämmen.
- (B) Das Lumineszenzsignal sinkt nach zirka zwei Stunden auf etwa 2000 Lumineszenzeinheiten ab und ist nach etwa 12 Stunden nicht mehr messbar.

N=3, n=9. Einseitige ANOVA mit Tukey's multiplen Vergleichstest. *signifikant zu WT SC5314 - Luc, #signifikant zu WT SC5314 + Luc, ###p<0,001, ****p<0,0001.

5.3 Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Eigenschaften der untersuchten *C. albicans*-Stämme

Abschließend sollte analysiert werden, ob die Expression der Luciferase einen Einfluss auf die Eigenschaften der untersuchten *Candida albicans*-Stämme im Vergleich zu deren Kontrollstämmen hat. Darüber hinaus war von Interesse, ob die Luciferase-Expression die stammspezifischen Eigenschaften der Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp verändert. Hierfür wurden das Wachstum, der pH-Wert, die Filamentierung und die Morphologie unter verschiedenen Bedingungen analysiert.

Das **Wachstum** wurde über die optische Dichte bei 600 nm für 24 Stunden in YPD-Flüssigmedium (pH 4 und 6,7) und YNB-Flüssigmedium, versetzt mit Ammoniumsulfat, gemessen (Abb. 9). Bei allen untersuchten Bedingungen zeigt sich, dass sowohl die Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämme als auch ihre Kontrollstämmen mit einer vergleichbaren optischen Dichte zu Beginn der Messung starten ($OD_{600\text{ nm}} \sim 0,2$). Auch die finale optische Dichte ist bei allen Stämmen und Medien vergleichbar ($OD_{600\text{ nm}} \sim 1,5$). Darüber hinaus ist zu sehen, dass auch der initiale pH-Wert des Mediums (Vergleich Abb. 9A vs. B und C vs. D) keinen Einfluss auf das Wachstum hat. Lediglich beim Vergleich des Voll- (YPD) und Minimalmediums (YNB) zeigen sich Unterschiede in der Geschwindigkeit des Wachstums. Nach einer Anlaufphase von zirka vier Stunden gehen die einzelnen Stämme bei beiden Medien und pH-Werten in die exponentielle Phase über. Im Vollmedium dauert diese zirka fünf Stunden, bevor nach neun Stunden die stationäre Phase erreicht ist (Abb. 9A und B). Im Minimalmedium dauert die exponentielle Phase etwa 11 Stunden (Abb. 9C und D). Die Deletion von *STP2* bzw. *STP2* und *AHR1* hat dabei keinen Einfluss auf das Wachstum.

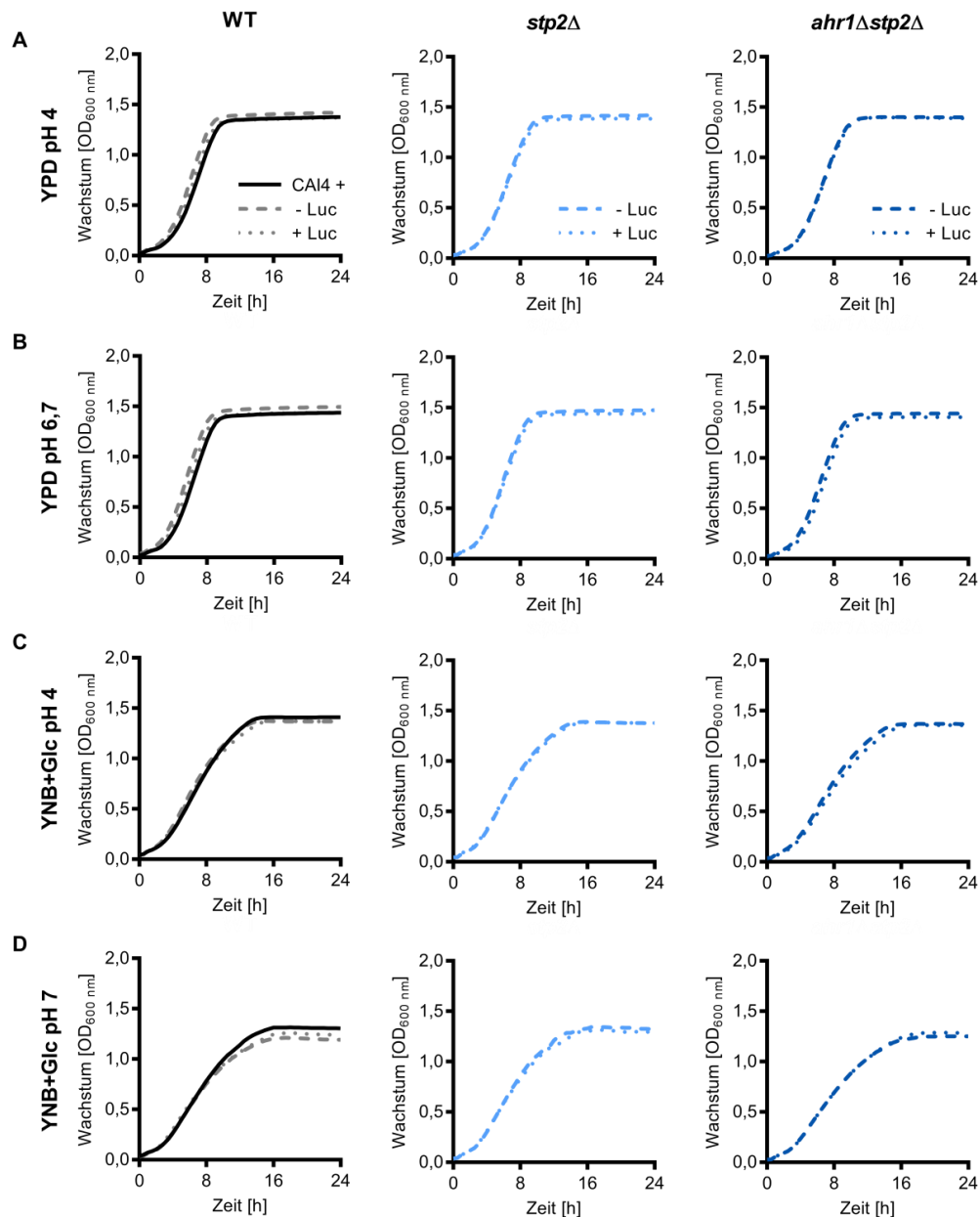


Abb. 9: Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf das Wachstum der untersuchten *Candida albicans*-Stämme.

Wachstumskurven der Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämme und ihrer Kontrollen in YPD-Flüssigmedium ((A) pH 4, (B) pH 6,7) und YNB-Medium mit Ammoniumsulfat ((C) pH 4, (D) pH 7). Nach einer Anlaufphase von etwa vier Stunden und starkem exponentiellen Wachstum geht das Wachstum nach fünf bis 11 Stunden in die stationäre Phase über. Die Expression der Luciferase hat dabei kein Einfluss auf das Wachstum unter allen getesteten Bedingungen. CAI4, WT SC5314 \pm Luc, *ahr1* Δ *stp2* Δ \pm Luc: N=4, n=12; *stp2* Δ \pm Luc: N=3, n=9.

Nach Beendigung der Wachstumsmessung wurde mittels einer Glasmikroelektrode in jeder Vertiefung der Mikrotiterplatte der **pH-Wert** gemessen, um auch hier zu überprüfen, ob die Expression der Luciferase einen Einfluss auf die Entwicklung des pH-Wertes hat und ob der für die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* beschriebene Alkalinisierungsdefekt in CAA-Medium weiterhin vorhanden ist (Abb. 10). Unabhängig vom verwendeten Medium zeigt sich, dass die Expression der Luciferase keinen Einfluss auf die Entwicklung des pH-Wertes im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollstämmen hat. Abb. 10A zeigt den nach 24 Stunden gemessenen pH-Wert der einzelnen *Candida albicans*-Stämme für die Medien mit einem Ausgangs-pH-Wert = 4,0. Während der pH-Wert aller Stämme in YPD pH4 minimal steigt kommt es bei YNB mit Glukose zu einer Ansäuerung des Mediums auf einen pH-Wert von etwa 3. Im Alkalinisierungsmedium (YNB + CAA) steigt der pH-Wert im Wildtyp von 4 auf 5,5–6. Bei den untersuchten Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* steigt der pH-Wert nur auf etwa 4,5 und ist damit im Vergleich zum Wildtyp signifikant geringer. Abb. 10B zeigt den gemessenen pH-Wert der einzelnen *Candida albicans*-Stämme für die Medien mit einem Ausgangs-pH-Wert von etwa 7,0 an. Während der pH-Wert aller *Candida albicans*-Stämme bei YPD pH ~ 7 auf 5,5 abgesenkt wird, sinkt der pH-Wert aller *Candida albicans*-Stämme in YNB mit Glukose-Medium pH 7,0 noch deutlicher auf 3,3 ab.

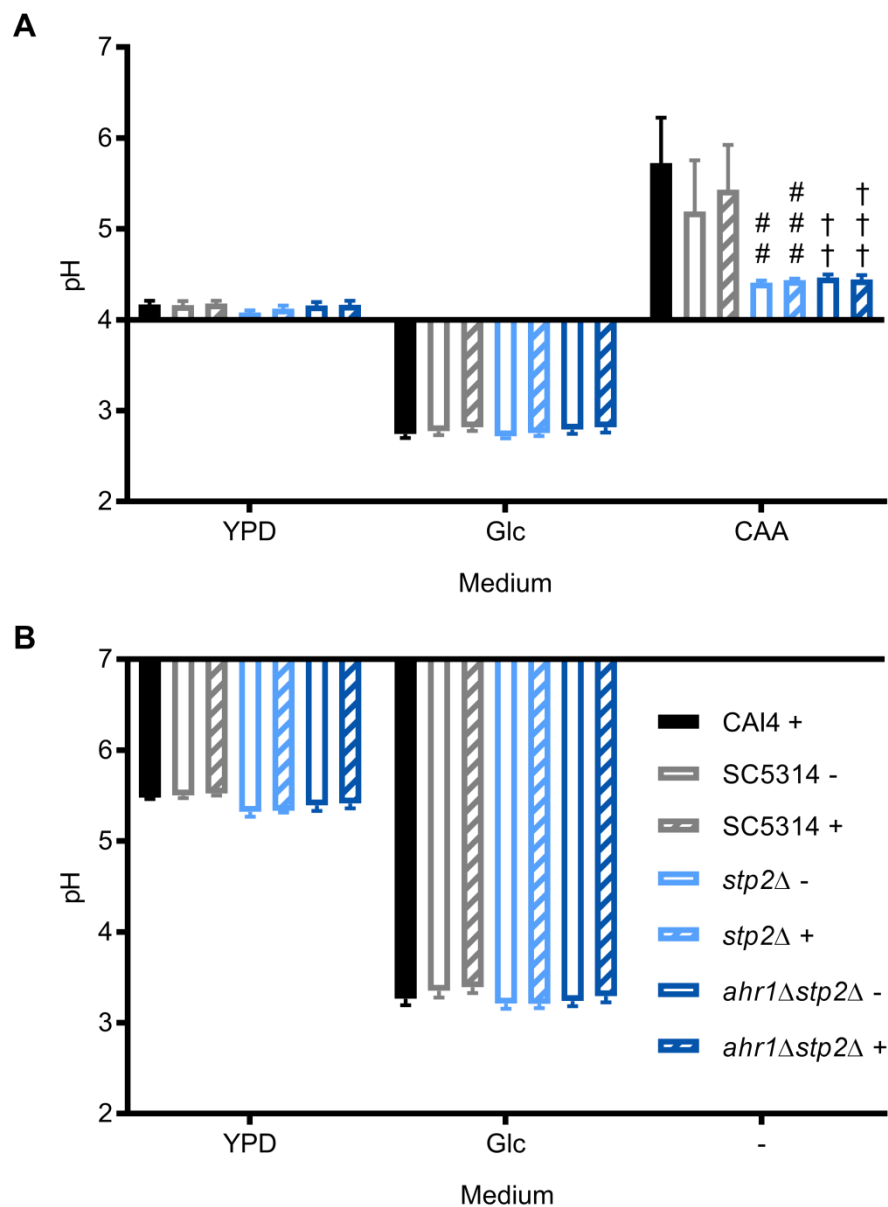


Abb. 10: Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Entwicklung des pH-Wertes der untersuchten *Candida albicans*-Stämme.

- (A) Veränderung des pH-Wertes in Medien mit einem Ausgangs-pH-Wert = 4.0. Bei allen untersuchten *Candida albicans*-Stämmen steigt der pH-Wert in YPD minimal an, bei YNB + Glc sinkt der pH-Wert auf zirka 3 und in YNB + CAA steigt der pH-Wert beim Wildtyp auf etwa 5,5–6, wohingegen der pH-Wert bei den Deletionsmutanten auf nur 4,5 ansteigt.
- (B) Veränderung des pH-Wertes in Medien mit einem Ausgangs-pH-Wert ~ 7.0. Bei allen untersuchten *Candida albicans*-Stämmen sinkt der pH-Wert in YPD auf etwa 5,5, bei YNB + Glc sinkt der pH-Wert auf zirka 3,3.

CAI4, WT SC5314 \pm Luc, *ahr1Δstp2Δ* \pm Luc: N=4, n=12; *stp2Δ* \pm Luc: N=3, n=9. Einseitige ANOVA mit Tukey's multiplen Vergleichstest. Signifikanz von #*stp2Δ* – Luc und †*ahr1Δstp2Δ* – Luc zu SC5314 – Luc bzw. Signifikanz von #*stp2Δ* + Luc und †*ahr1Δstp2Δ* + Luc zu SC5314 + Luc ###††p<0,01, ####†††p<0,001, #####††††p<0,0001.

Zur Untersuchung der **Filamentierung** wurden Luciferase-exprimierende und nicht Luciferase-exprimierende *Candida albicans*-Stämme in RPMI-Medium mit 10 % FBS (Abb. 11A) oder YNB mit CAA-Medium (Abb. 11B) inkubiert, fixiert und mikroskopisch analysiert (Abb. 12). RPMI-Medium mit 10 % FBS gilt hierbei als starker Hypheninduktor. Abb. 12A zeigt die mikroskopische Aufnahme im Differenzielleninterferenzkontrast (DIC) der kultivierten *Candida*-Stämme in RPMI. Wie erwartet zeigen alle *Candida*-Stämme in diesem Medium ein starkes Hyphenwachstum. Abb. 12B zeigt die mikroskopischen Aufnahmen der *Candida*-Stämme unter YNB (CAA) Kultivierung an. Dabei ist ein deutliches Hefen-Wachstum und auch ein reduziertes Hyphen-Wachstum erkennbar. Abb. 11 vergleicht die Verteilung (in %) der untersuchten Zellen in ihrer Form als Hyphen, Hefen oder „Germ-Tubes“. Es ist erkennbar, dass die Expression der Luciferase auch auf diesen Parameter keinen signifikanten Einfluss nimmt. In Abb. 11A weisen alle untersuchten *Candida*-Stämme unter RPMI-Medium sowohl starkes Hyphen-Wachstum als auch „Germ-Tubes“ auf, jedoch keine Hefen-Wachstum. Die Kultivierung der zu untersuchenden Stämme in YNB (CAA) zeigt ein deutlich reduziertes Hyphenwachstum und einen hohen Anteil der Hefen-Form, sowie vereinzelte „Germ-Tubes“. Abb. 12 zeigt einige Beispielbilder der in Abb. 11 gezeigten Daten.

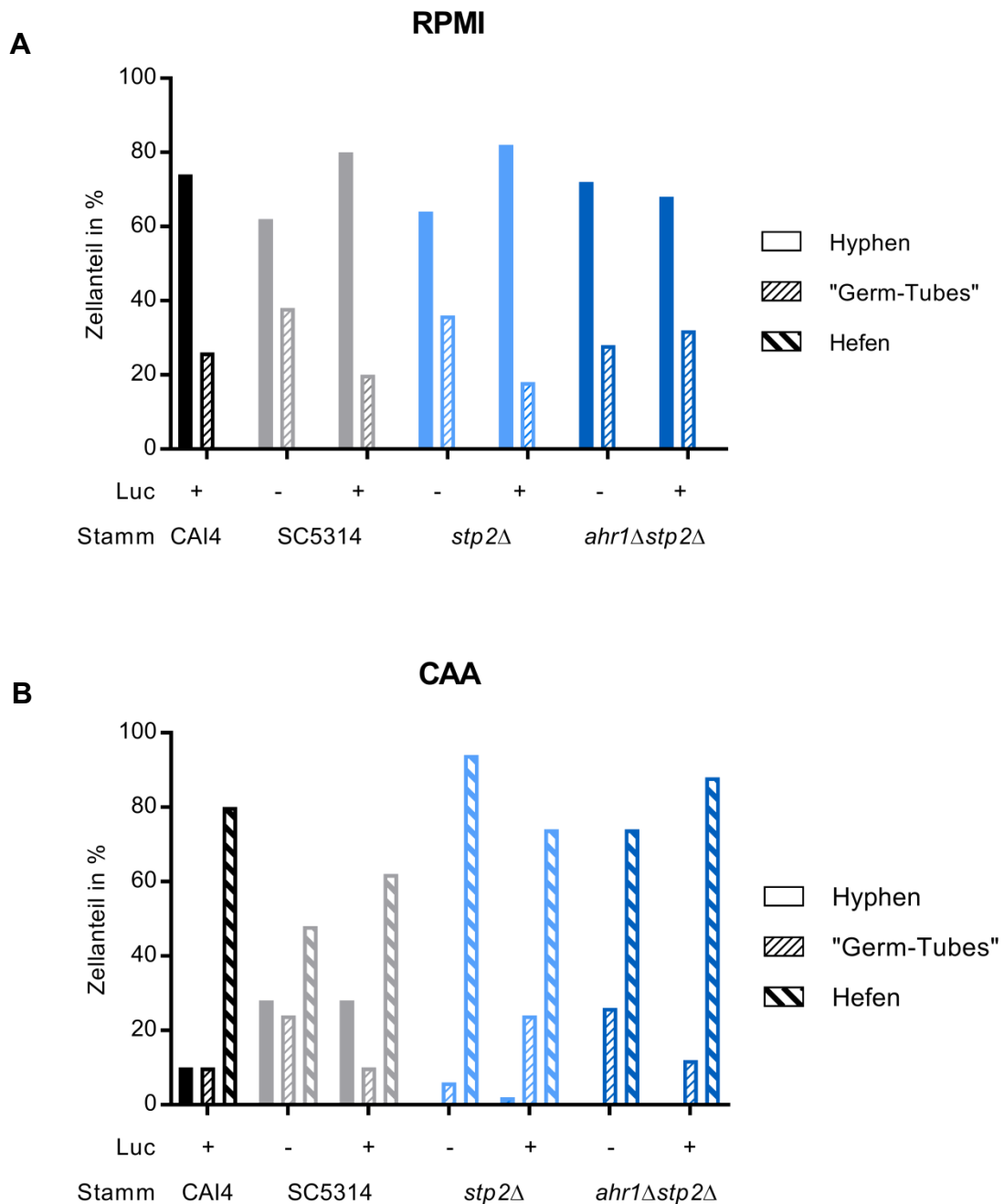


Abb. 11: Der Vergleich der Hyphen-Hefenform zeigt ein stark reduziertes Hyphenwachstum aller Stämme unter YNB (CAA) Medium.

- (A) Durchschnittliche Verteilung der untersuchten *Candida albicans*-Stämme nach Inkubation in RPMI mit 10 % FBS. Die Luciferase-Expression hat keinen Einfluss auf das morphologische Wachstum der Zellen. Zwischen WT und Mutanten lässt sich kein Unterschied feststellen N=4, n=4.
- (B) Durchschnittliche Verteilung der untersuchten *Candida albicans*-Stämme nach Inkubation in Alkalinisierungsmedium (YNB + CAA). Bei allen *Candida*-Stämmen ist ein reduziertes Hyphenwachstum und ein starkes Hefe-Wachstum zu erkennen N=3, n=3.

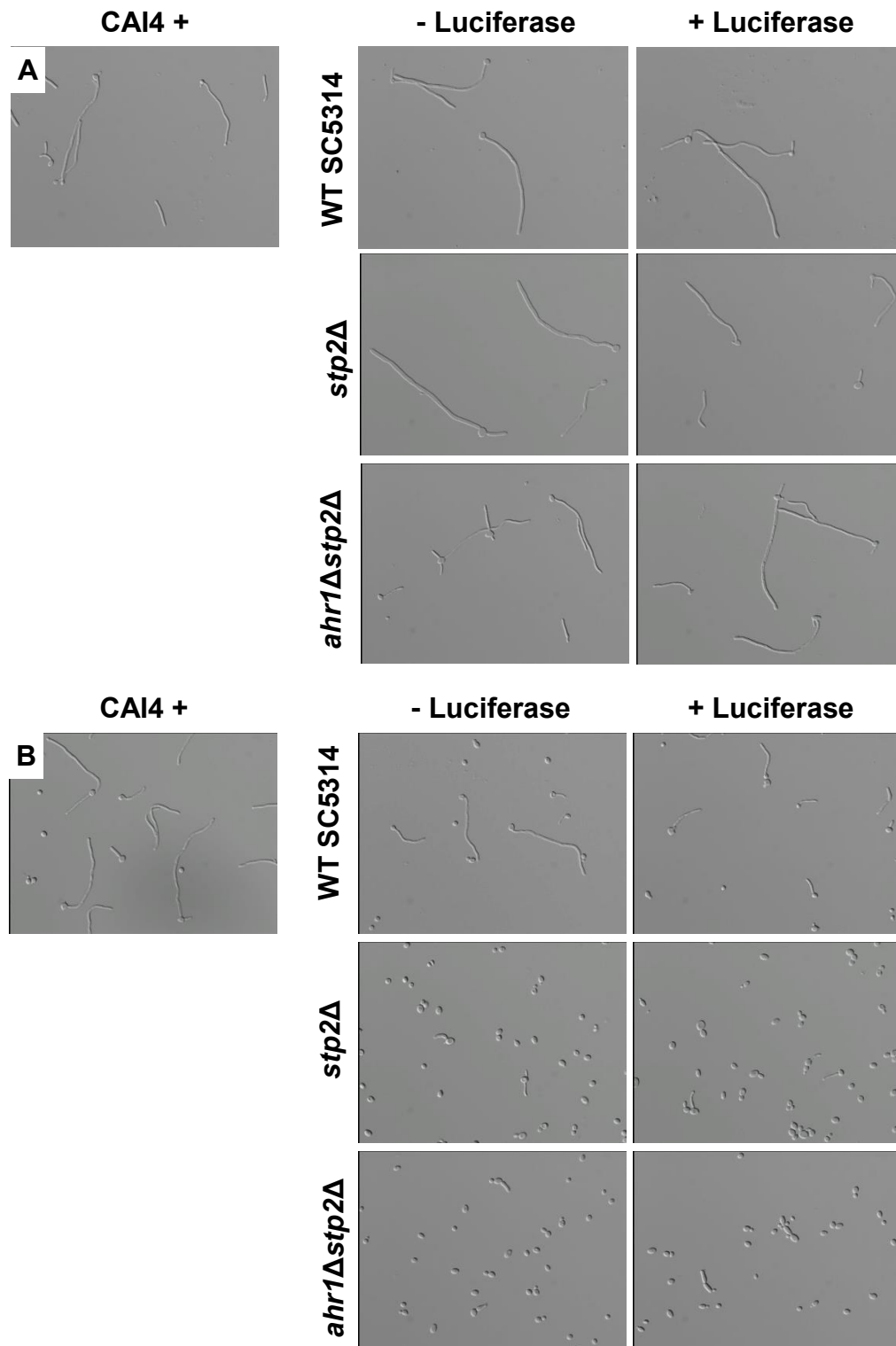


Abb. 12: Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Hyphenbildung der untersuchten *Candida albicans*-Stämme.

Mikroskopische Aufnahmen im Differenzielleninterferenzkontrast (DIC) der Hyphenbildung der *Candida albicans*-Stämme unter RPMI + 10 % FBS (A) und YNB + CAA (B). In RPMI + 10 % FBS-Medium bilden alle untersuchten Stämme Hyphen, wohingegen in YNB + CAA-Medium das Hyphenwachstum der Deletionsmutanten reduziert ist. Die Luciferase-Expression nimmt keinen Einfluss auf die Hyphenbildung der untersuchten *Candida albicans*-Stämme.

Abschließend sollte geklärt werden, ob die Expression der Luciferase die **Morphologie** beim Wachstum auf Festmedien beeinflusst. Hierfür wurde eine definierte Zellmenge auf Spider-Agar, einem Hyphenbildner-Medium, aufgetropft und bei 30 °C (Abb. 13A) bzw. 37 °C (Abb. 13B) inkubiert. Bei beiden Temperaturen lässt sich zeigen, dass zwischen Luciferase-exprimierenden und nicht Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämmen kein Unterschied in der Morphologie besteht. Alle Stämme zeigen eine runde Kolonieform. Unterschiede lassen sich aber beim Hyphenwachstum bei den verschiedenen Temperaturen beobachten. Bei 30 °C wachsen die Wildtyp-Stämme SC5314 (\pm Luc) und CAI4 (+Luc) als dicht gefaltete, echte Hyphen. Die Deletionsmutanten zeigen keine (*stp2* Δ) oder eine reduzierte Hyphenbildung (*ahr1* Δ *stp2* Δ) und bleiben weitestgehend glatt. Bei 37 °C sind die Defizite der Hyphenbildung bei den Deletionsmutanten kaum noch ausgeprägt, sodass bei allen Stämmen von einem Wachstum als „echte Hyphen“ gesprochen werden kann. Bei den Wildtypstämmen ist insbesondere in den Randbereichen eine ausgeprägte Faltenbildung zu beobachten.

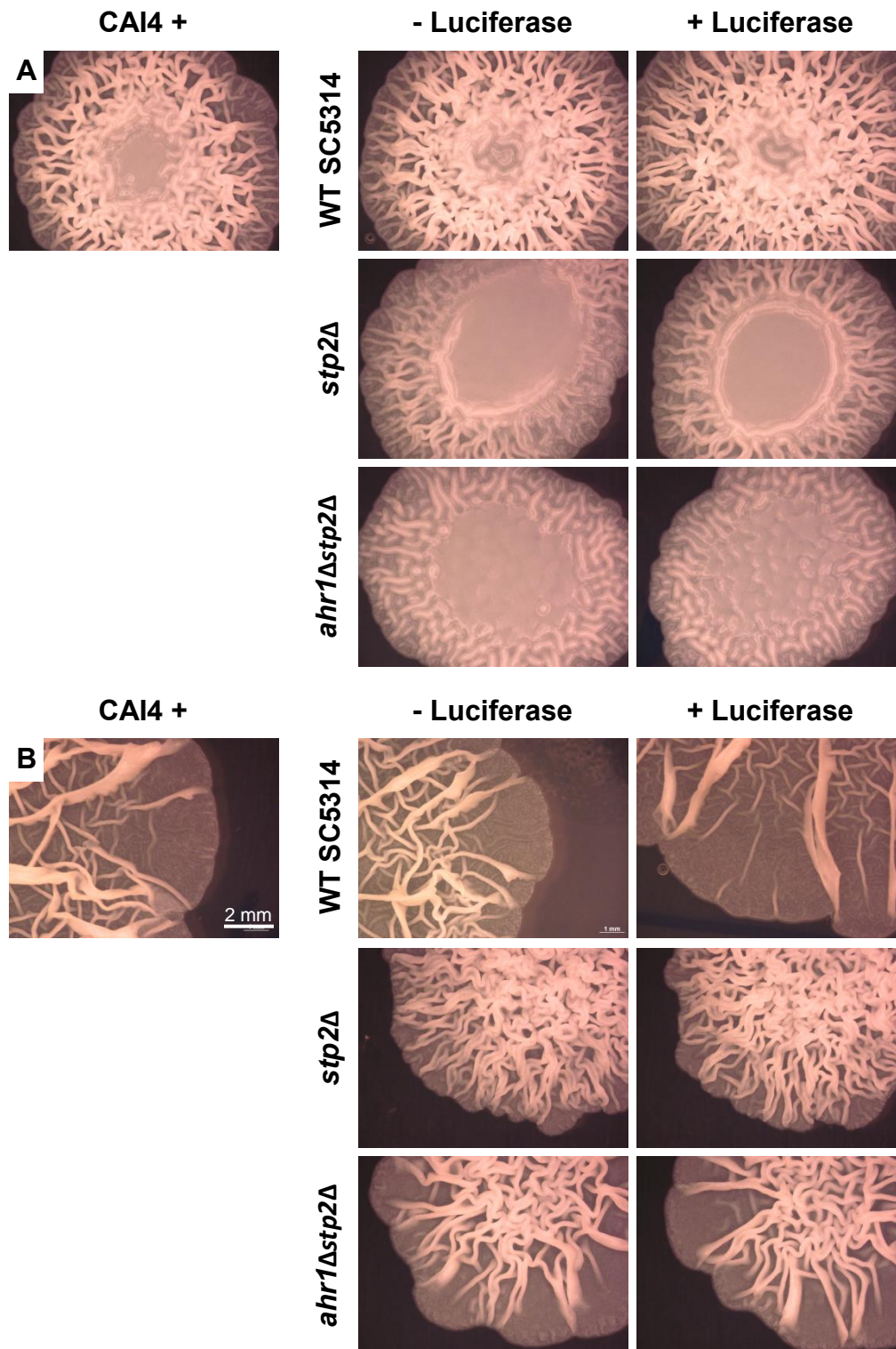


Abb. 13: Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Morphologie der untersuchten *Candida albicans*-Stämme.

Koloniemorphologie der *Candida albicans*-Stämme unter 30 °C (A) und 37 °C (B). Alle Stämme zeigen eine runde Kolonieform. Die Wildtyp-Stämme SC5314 (\pm Luc) und CAI4 (+ Luc) wachsen bei 30 °C als echte Hyphen, wohingegen die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* keine oder eine reduzierte Hyphenbildung aufweisen. Bei 37 °C wachsen alle Stämme als echte Hyphen. N=n=4.

6 Diskussion

6.1 Herstellung der Luciferase-exprimierenden Stämme *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ*

Um die Luciferase-exprimierenden Stämme herstellen zu können, musste im ersten Schritt die Transformationskassette *pADH1:luc(opt)* mit der Firefly-Luciferase aus dem Plasmid #138 mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NarI* und *SacI* ausgeschnitten werden. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Proben wurden die Gelbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend aufgereinigt. Die Aufreinigung der Transformationskassette wurde erneut gelelektrophoretisch überprüft (Abb. 6). Dabei zeigten die beiden Gelbilder unter dem UV-Spektrometer deutliche Banden bei ca. 5000 bp. Das Plasmid hat eine Größe von 7896 bp. Hiervon entsprechen 5028 bp der Luciferase-enthaltenden Transformationskassette und 2867 bp dem Plasmid-Rückgrat. Das Bandenmuster in Abb. 7 bestätigt, dass die Transformationskassette vollständig ausgeschnitten wurde. Nach der Transformation von *pADH1:luc(opt)* in die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* wurden die Zellen auf YPD-Agarplatten mit Nourseothricin ausplattiert um mittels des in der Transformationskassette enthaltenen Selektionsmarkers *SAT1* Klone zu identifizieren, die die Transformationskassette ins Genom integriert haben. Bei beiden Stämmen waren nach 24-stündiger Inkubation bei 30 °C zirka zehn Kolonien auf den Agarplatten zu sehen. Bei den entsprechenden Negativkontrollen, die keine Transformationskassette enthielten, waren keine Kolonien auf den YPD-Platten zu sehen. Von beiden Stämmen wurden jeweils vier Kolonien mittels Kolonie-PCR auf die erfolgreiche Integration der Transformationskassette untersucht. Hierfür wurden drei verschiedene Primerkombinationen verwendet. Das erste Primerpaar amplifiziert das 5'-Ende und liefert Rückschlüsse darauf, ob die Transformationskassette im *ADH1*-Locus integriert wurde. Für dieses Fragment war eine Größe von etwa 1200 bp zu erwarten. Bei beiden Stämmen war in jeweils drei von vier untersuchten Kolonien die entsprechende Bande zu sehen, sodass auf eine erfolgreiche Integration am *ADH1*-Locus geschlossen werden kann. Das zweite Primerpaar gibt Aufschluss über den internen Bereich des Luciferase-Gens. Für dieses Fragment war eine Größe von etwa 500 bp zu erwarten. Bei beiden Deletionsmutanten zeigten alle vier Kolonien Banden in beschriebener Größe, was auch hier auf eine korrekte Integration der Transformationskassette schließen lässt. Das dritte und letzte Primerpaar amplifiziert das 3'-Ende und liefert auch hier Rückschlüsse, ob die Integration der Transformationskassette an der richtigen Position erfolgte. Für diesen

Sequenzabschnitt war eine Fragmentgröße von 1200 bp zu erwarten. Auch bei dieser Primerkombination wiesen alle untersuchten Kolonien der beiden Stämme Banden mit entsprechender Fragmentgröße auf, was auf eine korrekte Integration am 3'-Ende schließen lässt.

Als Positiv- bzw. Negativkontrolle für die PCR wurde jeweils eine Kolonie des Luciferase-exprimierenden Wildtyp-Stammes SC5314 bzw. Wasser mitgeführt. Beim Wildtyp sind für alle drei Primerkombinationen die entsprechenden Banden zu sehen. Auffällig ist, dass die Intensität der Banden zum Teil stark variiert. Eine mögliche Ursache hierfür könnte eine geringere Zellmenge im PCR-Ansatz sein. Für die weiteren Versuche wurde von jedem Stamm die Kolonie mit dem stärksten Signal ausgewählt: für *stp2Δ* Kolonie Nr. 4 und für *ahr1Δstp2Δ* Kolonie Nr. 1. Eine weitere Bestätigung für die erfolgreiche Integration der Transformationskassette im *ADH1*-Locus lieferte auch eine Sequenzierung entsprechender PCR-Produkte (Daten nicht gezeigt).

6.2 Verifizierung der Luciferase-Expression in verschiedenen *Candida albicans*-Stämmen mittels Biolumineszenz

Die in dieser Arbeit hergestellten und charakterisierten Luciferase-exprimierenden *Candida albicans*-Stämme sollen in zukünftigen Versuchen verwendet werden, um den Infektionsverlauf von *Candida* spp. in Brandwunden zu untersuchen. Daher wurde nach Überprüfung der Integration der Luciferase ins Genom auch untersucht, ob die Luciferase exprimiert wird und folglich ein Lumineszenzsignal gemessen werden kann (Abb. 8). Für diesen Versuch wurden pro Vertiefung der Mikrotiterplatte 2×10^5 Zellen eingesetzt und 1,6 µl D-Luciferin (5 mg/ml) zugegeben. Das Lumineszenzsignal wurde für zwölf Stunden alle 30 min bei 37 °C gemessen. In Abb. 8A ist gezeigt, dass die biolumineszenten Wildtypstämme CAI4, WT SC5314 und die beiden biolumineszenten Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* ein deutliches Lumineszenzsignal bei etwa 4000 bis 10000 Lumineszenzeinheiten zeigen. Dieses Signal ist etwa 450-mal höher als das der entsprechenden Kontrollstämme, die keine Luciferase exprimieren. Die Kontrollstämme zeigen ein zur Mediumkontrolle vergleichbares, sehr niedriges Hintergrundsignal. Diese Ergebnisse bestätigen die Aussage der vorangegangenen Kolonie-PCR und Sequenzierung und damit die korrekte Integration und Funktion der Luciferase im Genom der einzelnen Stämme. Vergleicht man die biolumineszenten Wildtypstämme CAI4 und SC5314, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied im Lumineszenzsignal. Eine mögliche Erklärung könnten die unterschiedlichen

Promotoren *ACT1* (CAI4) und *ADH1* (SC5314) liefern. Der *ADH1*-Promotor wurde in diesem Versuch verwendet, da er eine stabilere, höhere Genexpression (Seneviratne, Jin, and Samaranayake 2008) der Luciferase ermöglicht. Dies ist insbesondere im Tiermodell wichtig, wenn eine Infektion über einen bestimmten Zeitbereich untersucht werden soll. Zum anderen sollen durch Verwendung dieses Promotors laborinterne Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Mutanten erhalten bleiben. Eine Begründung für die Verwendung des Wildtypstammes SC5314 ist, dass die in dieser Arbeit untersuchten Deletionsmutanten auf Basis dieses Wildtyps hergestellt wurden und somit eine entsprechende Referenz für zukünftige Tierversuche bietet. Der von Prof. Jacobsen zur Verfügung gestellte CAI4-Wildtyp hat einen anderen genetischen Hintergrund und wurde für die in dieser Arbeit durchgeführten *in vitro*-Versuche als weitere Referenz eingesetzt.

Betrachtet man die Entwicklung des Lumineszenz-Signales über die Zeit (Abb. 8B), so sinkt dieses innerhalb der ersten zwei Stunden auf etwa 1000 bis 2000 Lumineszenzeinheiten ab. Eine mögliche Erklärung hierfür ist das Wachstum der Zellen im YPD-Medium (vgl. Abschnitt 6.3). In YPD-Vollmedium zeigen alle Stämme ein starkes Wachstum bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm von 1,5. Bei der hier durchgeführten Messung wurde nur eine geringe Menge D-Luciferin eingesetzt. Möglicherweise ist diese Menge zu Beginn der Messung ausreichend. Wenige Zellen können das vorhandene D-Luciferin umsetzen und damit ein starkes Lumineszenzsignal aussenden. Im weiteren Verlauf kommt es jedoch zu einer Vermehrung der Zellen, die immer mehr D-Luciferin metabolisieren, bis schließlich nach zirka zehn Stunden kein D-Luciferin mehr vorhanden ist, welches umgesetzt werden könnte. Es ist kein Lumineszenzsignal mehr messbar. Dieser Versuch könnte optimiert werden, in dem zum einen mehr D-Luciferin eingesetzt wird und zum anderen alle fünf bis zehn Minuten gemessen wird, um einen detaillierten Kurvenverlauf zu erhalten. Dies würde eine präzisere Aussage über die Stabilität des Lumineszenzsignales ermöglichen. Weiterhin könnten sowohl Wachstum als auch Lumineszenz in phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) bei 30 °C wiederholt untersucht werden. Wäre in diesem Ansatz kein oder nur ein geringes Wachstum zu beobachten, sollte das Lumineszenzsignal stabiler sein. PBS ist insofern für das Tiermodell relevant, als dass die Zellen in PBS verdünnt und appliziert werden. Eine Temperatur von 25–30 °C sollte darüber hinaus ein geringeres Wachstum induzieren und findet sich schließlich auch an der Oberfläche der Haut.

Ein abschließender Vergleich mit einer 2014 von Jacobsen *et al.* veröffentlichten Studie zeigt höhere Lumineszenzsignale für den CAI4-Stamm in YPD-Medium *in vitro* (Jacobsen et al. 2014). Dies kann mit der höheren Menge an eingesetztem D-Luciferin erklärt werden. Im entsprechenden Tiermodell zeigt dieser Stamm ein zu den hier gezeigten Werten vergleichbares Signal von 4000 Lumineszenzeinheiten (Jacobsen et al. 2014).

6.3 Die Expression der Luciferase hat keinen Einfluss auf die Eigenschaften der untersuchten *Candida albicans*-Stämme

Die Charakterisierung der Luciferase-exprimierenden Stämme war notwendig um auszuschließen, dass die Expression der Luciferase einen Einfluss auf verschiedene Eigenschaften der untersuchten Stämme hat. Folgende Parameter wurden untersucht: Wachstum, pH-Wert, Filamentierung und Morphologie.

Das **Wachstum** der einzelnen Stämme wurde für 24 Stunden bei 37 °C in zwei verschiedenen Flüssigmedien (YPD vs. YNB mit Glukose) bei zwei unterschiedlichen pH-Werten (pH 4 vs. pH 7) in 96-Wellmikrotiterplatten untersucht. Die optische Dichte wurde bei 600 nm alle 30 min gemessen. In Abb. 9 ist gezeigt, dass zwischen den Luciferase-exprimierenden und den entsprechenden Kontrollstämmen keine Unterschiede bezüglich des Wachstumsverhaltens auftreten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die Expression der Luciferase keinen Einfluss auf das Wachstum der Stämme unter den verschiedenen Bedingungen hat.

Einen bedeutenderen Einfluss hingegen hat die Wahl des Mediums (Vollmedium vs. Minimalmedium). Das Vollmedium (YPD) enthält neben 1 % Hefeextrakt und 2 % Pepton auch 2 % Glukose und alle Aminosäuren, die für das Wachstum notwendig sind. Bei Wachstum der verschiedenen Stämme in YPD-Medium wird die stationäre Phase bei einer optischen Dichte von etwa 1,5 bereits nach acht Stunden erreicht. Der initiale pH-Wert des Mediums hat hierbei keinen Einfluss auf das Wachstum. Das hier verwendete YNB-Basismedium enthält zwar ebenfalls 2 % Glukose, aber keine Aminosäuren. Als alternative Stickstoffquelle wurde 0,5 % Ammoniumsulfat zugesetzt. Basierend auf der Zusammensetzung dieses Mediums erreichen sowohl die Luciferase-exprimierenden als auch die entsprechenden Kontrollstämmen in der stationären Phase bei einer Wellenlänge von 600 nm ebenfalls eine optische Dichte von zirka 1,5, wobei diese erst nach zirka 14 Stunden erreicht wird. Auch bei dieser Bedingung hat der initiale pH-Wert des Mediums keinen Einfluss auf das Wachstum.

So kann schlussgefolgert werden, dass für die Anzucht von *Candida albicans* sowohl YPD als auch YNB Medium geeignet ist. (Kumamoto and Vines 2005).

Nach Beendigung der Wachstumsmessung wurde in jeder Vertiefung mit einer kalibrierten Glaselektrode der **pH-Wert** gemessen. In Abb. 10 ist gezeigt, dass zwischen Luciferase-exprimierenden und den entsprechenden Kontrollstämmen kein Unterschied bei der pH-Wert-Entwicklung nach 24 Stunden auftritt. Dies lässt auch hier den Schluss zu, dass die Luciferase-Expression keinen Einfluss auf die Metabolisierung des Mediums durch *C. albicans* und damit auch keinen Einfluss auf die Entwicklung des pH-Wertes hat.

Bei Betrachtung der verschiedenen Medien lassen sich jedoch deutlichere Unterschiede im Vergleich des Wildtyps mit den Mutanten-Stämmen *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* feststellen. Diese Unterschiede sind auf die Zusammensetzung der Flüssigmedien zurückführen.

Bei Wachstum der Stämme in YPD-Medium zeigt sich sowohl bei einem Start-pH-Wert von 4 als auch bei zirka 7 kein Unterschied zwischen den Stämmen. Bei pH 4-Medium ist ein minimaler Anstieg des pH-Wertes zu sehen, der aber im Vergleich zum Start-pH keinen signifikanten Unterschied darstellt (Abb. 9). Im Gegensatz dazu senkt sich der pH-Wert des YPD pH7-Mediums auf etwa 5,5 ab, was auf die Verstoffwechselung der Glukose zu verschiedenen Säuren zurückzuführen ist.

Dieser Stoffwechselprozess findet auch im YNB-Medium mit Glukose statt, wobei hier im Vergleich zum YPD-Vollmedium eine deutlich stärkere Reduktion des pH-Wertes zu beobachten ist. Sowohl bei einem initialen pH von 4 als auch 7 kommt es zu einer Ansäuerung des Mediums, die in einem pH-Wert von zirka 3 resultiert.

Die pH-Wert-Änderungen in den beiden Medien könnten sich anhand der unterschiedlichen Pufferkapazitäten ableiten lassen. Diese liegt im YPD-Medium höher und mit einem optimal eingestellten pK_b -Wert bei einem pH-Wert von etwa 5,5. Aus diesem Grund ändert sich der pH-Wert in YPD pH 4 nur gering, hingegen in pH 7 wesentlich deutlicher. Das YNB-Medium scheint eine solche Pufferkapazität nicht zu besitzen, was sich in einer drastischen pH-Wert Änderung äußert. Diese Hypothese muss jedoch noch durch weitere Tests bestätigt werden.

Das letzte Medium ist ebenfalls ein Minimalmedium aus YNB mit Ammoniumsulfat als Stickstoffquelle, welches aber anstelle von Glukose Aminosäuren als Kohlenstoffquelle enthält. Wird die Entwicklung des pH-Wertes in YNB mit CAA betrachtet, so zeigt sich in den Wildtyp-Stämmen eine Erhöhung des pH-Wertes auf zirka 5,5–5,9. Bei den

Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* erfolgt die Alkalinisierung des Mediums nur bis zu einem pH von 4,5. Dieses Ergebnis bestätigt eine Publikation von Vylkova *et al.*, in der gezeigt wurde, dass diese beiden Mutanten einen Alkalinisierungsdefekt aufweisen (Vylkova and Lorenz 2017). Die beiden Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* weisen eine Störung der Expression von Aminosäurepermeasen auf, welche mithilfe der beiden Transkriptionsfaktoren Ahr1 und Stp2 reguliert werden können (Vylkova and Lorenz 2017). Aminosäurepermeasen sind für den Transport von Aminosäuren in die Zelle verantwortlich, was bedeutet, dass die Deletionsmutanten aufgrund der zu geringen Anzahl an Aminosäurepermeasen nur eine geringe Menge Aminosäuren in die Zelle transportieren können. Infolgedessen kann intern kein Ammonium produziert, welches zytotoxisch wirken könnte. Die Deletionsmutanten können folglich auf Aminosäure-enthaltendem Nährmedium weniger gut wachsen, sodass in den Ergebnissen auch keine Alkalisierung des Mediums zu beobachten war. In der Publikation von Vylkova *et al.* (Vylkova and Lorenz 2017) wird für den Wildtyp-Stamm ein Anstieg des pH-Wertes >7 beschrieben. Dies kann in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung liefert das hier verwendete Testsystem: Zwar wurde sowohl in dieser Arbeit als auch in der Publikation von Vylkova *et al.* eine Start-OD von 0,2 (600 nm) eingesetzt. In dieser Arbeit wurden aber anstelle von Erlenmeyerkolben Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen verwendet. Das geringere Probenvolumen und andere Schüttelverhalten weisen ein langsames Wachstum mit einer langsameren Alkalisierungsrate auf, was sich auch in einem geringeren Anstieg des pH-Wertes zeigt (Abb. 10).

Für die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* wurde bei Wachstum in YNB mit CAA-Medium, neben einer lediglich geringen Erhöhung des pH-Wertes, nicht nur ein Alkalinisierungsdefekt beschrieben, sondern auch Einschränkungen in der Hyphenbildung und **Filamentierung** festgestellt. Daher wurde auch dieser Parameter nach vierstündiger Hypheninduktion in CAA bei 37 °C untersucht (Abb. 11). Als Vergleichsmedium diente ein reichhaltiges Flüssigmedium (RPMI +10 % FBS), welches einen Ausgangs-pH-Wert von 7,4 besitzt. Dieser neutrale pH-Wert ist ausschlaggebend für das hypheninduzierende Wachstum der Zellen. Der Effekt der Hyphalmorphogenese wird durch den Zusatz von 10 % fetalem Rinderserum, welches eine Vielzahl von Proteinen enthält, weiter verstärkt (10 % FBS).

Zunächst fällt auf, dass die Verteilung der Zellen in Hyphen, Hefen und „Germ-Tubes“ in RPMI- und YNB mit CAA-Medium stark variiert. Als „Germ-Tubes“ werden die

Candida-Zellen bezeichnet, bei der die Hyphenlänge nicht länger als die eigene Zellgröße ist. Bei Inkubation in RPMI-Medium bei 37 °C wird ein so starkes Hyphenwachstum induziert, dass die Zellen verklumpen (Doyle et al. 2006). Dies zeigte sich auch bei Betrachtung des Reaktionsgefäßes (Daten nicht gezeigt). Beim Betrachten der Beispielbilder zeigen sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich der Zellform zwischen Luciferase-exprimierenden und den entsprechenden Kontrollstämmen, jedoch beim Vergleich des Wildtyps mit den Deletionsmutanten. Daraus kann erneut geschlussfolgert werden, dass die Expression der Luciferase keinen Einfluss auf das Filamentierungsverhalten der einzelnen Stämme hat. Im YNB mit CAA-Medium sind ebenfalls keine Unterschiede zwischen Luciferase-exprimierenden und entsprechenden Kontrollstämmen zu sehen, sodass geschlussfolgert werden kann, dass die Expression der Luciferase das Hyphenwachstum nicht verändert. Bei Verwendung dieses Mediums sind beim Wildtyp deutlich weniger Hyphen im Vergleich zum RPMI-Medium. Ein stärkerer Effekt findet sich in den Deletionsmutanten, was anhand von Abb. 12 deutlich wird. Hier sind ca. 1 % Hyphenanteil im Vergleich zum Wachstum in RPMI-Medium vorhanden. Eine mögliche Erklärung für den geringeren Hyphenanteil im YNB mit CAA könnte der Ausgangs-pH-Wert des Mediums von 4,0 sein. Der pH-Wert liegt im Vergleich zum RPMI-Medium im aziden Bereich der pH-Skala und stellt somit keine optimalen Bedingungen für Hyphenwachstum dar. Die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* zeigten zudem in CAA-Medium nur sehr vereinzelt Hyphenwachstum. Auch dieses Ergebnis bestätigt frühere Publikationen (Askew et al. 2011) und lässt sich mit den vorangegangenen pH-Wert-Analysen in Einklang bringen. Ein alkalischer pH-Wert bildet dabei die Grundlage für das hyphen-induzierte Wachstum und damit einhergehend die Virulenz von *C. albicans* (Tsui, Kong, and Jabra-Rizk 2016). Aufgrund des Alkalisierungsdefekts der Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* sind diese nicht in der Lage eine große Anzahl Aminosäurepermeasen zu exprimieren, Ammonium zu produzieren und den pH-Wert der Umgebung zu neutralisieren (Vylkova et al. 2011). So konnte an einem Mausmodell für Candidose bereits bei der *Stp2*-Mutante eine verringerte Virulenz nachgewiesen werden (Vylkova and Lorenz 2017).

Die Ergebnisse der Filamentierung konnten auch auf Spideragarplatten bestätigt werden (Abb. 13). Für die Untersuchung der **Morphologie**, wurde von allen Stämmen eine definierte Zellmenge auf Spideragar aufgetropft und bei 30 °C ohne CO₂ und 37 °C mit 5% CO₂ inkubiert. Spideragar besteht aus Hefeextrakt, Mannitol, K₂PO₄

(Hauptkomponente für Hypheninduktor) und Agar, hat einen pH-Wert von 7,2 und ist folglich ein starker Hypheninduktor. Betrachtet man das Wachstum bei 30 °C und 37 °C so ist bei beiden Temperaturen kein Unterschied zwischen Luciferase-exprimierenden und entsprechenden Kontrollstämmen zu beobachten. Alle Kolonien zeigen eine rundliche Form. Bei 30 °C (Abb. 13A) zeigen die Wildtyp-Stämme echte Hyphenbildung, wohingegen die *stp2Δ*-Deletionsmutante keine Hyphenbildung und die *ahr1Δstp2Δ*-Deletionsmutante eine reduzierte Hyphenbildung zeigt. Dies bestätigt bereits publizierte Wachstumsdefizite der hier untersuchten Deletionsmutanten. Im Gegensatz dazu zeigen bei 37 °C und 5 % CO₂ (Abb. 13B) alle Stämme echte Hyphen (Vylkova et al. 2011). Die Kolonien der Deletionsmutanten sind um 10,2 µm kleiner als die der Wildtyp-Stämme (Daten nicht gezeigt). Auffällig ist, dass die Kolonien der *stp2Δ*-Deletionsmutante bei 37 °C morphologische Ähnlichkeit zum Wildtyp bei 30 °C zeigen. Dies lässt auf verschiedene Zwischenstadien des filamentösen Wachstums schließen, welches zunächst mit einem runden und afilamentösen Zustand beginnt und sich über einen stark faltigen, runden Zustand bis hin zu einer grobfaltigen, nicht runden Morphologie entwickelt. Dies könnte ebenfalls das verringerte oder langsamere Wachstum der Deletionsmutante bestätigen. Möglicherweise würde die Deletionsmutante bei längerer Inkubationszeit bei 37 °C eine zum Wildtyp vergleichbare Morphologie entwickeln. Aufgrund der bisher erlangten Erkenntnisse zu diesen interessanten Phänotypen, könnten weitere Untersuchungen Aufschluss über die Morphologie der Mutanten-Stämme geben.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Expression der Luciferase das Wachstum, Entwicklung des pH-Wertes, Hyphenbildung und Morphologie der untersuchten *Candida albicans*-Stämme nicht beeinträchtigt. Folglich würde der Einsatz dieser Stämme im Tiermodell zu den gleichen Ergebnissen führen wie Kontrollstämmen, die keine Luciferase exprimieren. Derartige Kontrollstämmen sind aber nicht geeignet um den Verlauf einer *Candida*-Infektion im Tiermodell zu verfolgen. Ein weiterer Parameter, der im Tiermodell relevant sein könnte, ist die Biofilmbildung von *C. albicans*. Diese sollte vor Einsatz der untersuchten Stämme im Tiermodell noch in einem *in vitro*-Versuch analysiert und verglichen werden. Die untersuchten Deletionsmutanten mit Defekten in Alkalinisierung und Hyphenbildung im Vergleich zum Wildtyp könnten Aufschluss darüber bringen, welche Gene und Virulenzfaktoren bei der Infektion von Brandwunden eine Rolle spielen.

7 **Ausblick**

Die im Rahmen dieser Bachelorarbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass die Expression der Luciferase keinen Einfluss auf die Charakteristika der untersuchten *Candida albicans*-Stämme hat. Vorangegangene Untersuchungen der Deletionsmutanten bezüglich ihrer Defekte in Alkalinisierung und Hyphenbildung (Vylkova and Lorenz 2017) konnten bestätigt und auch in den Luciferase-exprimierenden Stämmen gezeigt werden.

Zur weiteren Charakterisierung könnten die Experimente für die bereits untersuchten Parameter in einem Medium wiederholt werden, welches in der Zusammensetzung den metabolischen Bedingungen einer Brandwunde ähnelt. Auch wäre eine Messung bei 30 °C statt 37 °C Temperierung denkbar, da die Hautoberfläche einer Ratte eine Temperatur von 25 - 30 °C aufweist. Ein weiterer wichtiger Parameter, der zukünftig noch untersucht werden sollte, ist die Biofilmbildung von *C. albicans*.

Die in dieser Arbeit charakterisierten Luciferase-exprimierenden *C. albicans*-Stämme sollen zukünftig in einem Brandwundeninfektionsmodell an Ratten eingesetzt werden. Unter Verwendung dieser Stämme ist es möglich, den zeitlichen und räumlichen Verlauf der Infektion zu analysieren. Von großer Bedeutung sind dabei die Deletionsmutanten, welche im Vergleich zum Wildtyp Aufschluss darüber bringen könnten, welche Gene und Virulenzfaktoren bei der Infektion von Brandwunden eine Rolle spielen. Darüber hinaus können anhand des Modells und der damit erstellten Infektionsanalyse gezielt Antimykotika zur Bekämpfung der Infektion entwickelt werden oder durch Zugabe bestimmter Stoffe die metabolische Zusammensetzung der Wunde oder der gegenwärtigen pH-Wert angepasst werden.

8 Zusammenfassung

Candida albicans ist ein Kommensale und Teil des menschlichen Mikrobioms. Unter bestimmten Umständen kann *C. albicans* Infektionen verursachen, die von oberflächlichen Infektionen der Haut bis hin zu lebensbedrohlichen systemischen Infektionen reichen. Die pathogene Form des *C. albicans* besitzt zwei Transkriptionsfaktoren, Stp2 und Ahr1, über die der Umgebungs-pH-Wert neutralisiert werden kann und infolgedessen ein hyphales Wachstum induziert wird. Mutanten, bei denen diese Transkriptionsfaktoren fehlen, können den pH-Wert der Umgebung nicht erhöhen und somit keine Hyphen ausbilden, was zu einer Verringerung der Virulenz führen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Luciferase-exprimierende *Candida albicans*-Stämme (Wildtyp und Mutanten) hergestellt und *in vitro* charakterisiert. Diese Stämme sollen in einem späteren Brandwundeninfektionsmodell in Ratten eingesetzt werden, um den Infektionsverlauf nach Applikation von *C. albicans* *in vivo* zu untersuchen und mögliche Virulenzfaktoren zu identifizieren.

Zunächst wurde die Transformationskassette pADH1:*luc*(opt) in die beiden Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* transformiert und mittels Kolonie-PCR und Sequenzierung bestätigt. Das hohe Biolumineszenzsignal Luciferase-exprimierender *Candida albicans*-Stämme bestätigte ebenfalls die erfolgreiche Integration der Transformationskassette. Im Zuge einer Messung der Lumineszenz über 24 Stunden konnte gezeigt werden, dass das Signal nach zwei Stunden stark sinkt und nach zwölf Stunden vollständig erlischt. Die Charakterisierung der *Candida albicans*-Stämme ergab, dass die Expression der Luciferase keinen Einfluss auf Wachstum, Entwicklung des pH-Wertes, Hyphenbildung und Morphologie der untersuchten *C. albicans*-Stämme nimmt. Die Untersuchungen des pH-Wertes der Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* ergab eine Alkalinisierung in YNB (CAA)-Medium bis zu einem pH von 4,5. Die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* zeigten darüber hinaus in selbigem Medium nur sehr vereinzelt Hyphenwachstum. Diese Ergebnisse bestätigen frühere Publikationen (Vylkova et al. 2011) und zeigen, dass die Deletionsmutanten *stp2Δ* und *ahr1Δstp2Δ* aufgrund des Alkalinisierungsdefektes nicht in der Lage sind, den pH-Wert der Umgebung zu erhöhen. Die untersuchten Deletionsmutanten liefern wichtige Erkenntnisse zur Virulenzadaptation von *C. albicans* und könnten im Vergleich zum Wildtyp Aufschluss darüber bringen, welche Gene und Virulenzfaktoren bei der Infektion von Brandwunden eine Rolle spielen.

9 Summary

Candida albicans is a human commensal eukaryote and part of the microbiota on mucous membranes and the skin. Various conditions of *C. albicans* can influence the development of infections which vary from superficial skin infections to life-threatening, systemic infections. Due to two transcription factors Stp2 and Ahr1, the pathogenic form of *C. albicans* can neutralize the ambient pH value and consequently induce hyphal growth, a major virulence factor. Mutants with a defect in these transcription factors are not able to increase the pH value of the environment and thus do not form hyphae, leading to a reduction of its virulence. Within the scope of this work, luciferase-expressing bioluminescent *C. albicans* strains were generated and characterized, as they will be used in a future burn wound infection model in rats to investigate the course of infection after application of *C. albicans in vivo*.

First, the transformation cassette pADH1:*luc*(opt) was transformed into the two deletion mutants *stp2* Δ and *ahr1* Δ *stp2* Δ . Electrophoretic analyses of the colony PCR and sequencing of the samples confirmed the successful transformation into the two mutant strains. The result of the bioluminescence signal measurement showed a significantly increased signal of all analyzed luciferase-expressing strains. In a 24-hour luminescence measurement, the signal decreased severely after two hours and went out completely after 12 hours. The characterization of the *C. albicans*-strains revealed that the expression of luciferase does not affect growth, extracellular pH, hyphal growth and morphology. The studies on the pH of the mutants *stp2* Δ and *ahr1* Δ *stp2* Δ resulted in an alkalinization in YNB (CAA) medium up to a pH of 4.5 in comparison to the wild type strain with a pH of 6.5. In the same medium, the mutants *stp2* Δ and *ahr1* Δ *stp2* Δ showed only isolated hyphal growth. These results confirm earlier publications and show that due to the alkalinization defect the mutants *stp2* Δ and *ahr1* Δ *stp2* Δ are not able to increase the pH of the environment and induce hyphal growth (Vylkova et al. 2011). The studied alkalinization and morphogenesis-defective mutants would serve as an excellent model to track quantitatively the importance of metabolic adaptation and pH modulation on the development of burn wound candidiasis.

Literaturverzeichnis

- Askew, Christopher, Adnane Sellam, Elias Epp, Jaideep Mallick, Hervé Hogues, Alaka Mullick, Andre Nantel, and Malcolm Whiteway. 2011. *The Zinc Cluster Transcription Factor Ahr1p Directs Mcm1p Regulation of Candida Albicans Adhesion*. *Molecular Microbiology*. Vol. 79. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07504.x.
- Chandra, Jyotsna, Duncan M Kuhn, Pranab K Mukherjee, Lois L Hoyer, Thomas McCormick, Mahmoud A Ghannoum, a Mahmoud, Thomas M C Cormick, Mahmoud A Ghannoum, and Jonathan S. Finkel and Aaron P. Mitchell. 2001. "Genetic Control of Candida Albicans Biofilm Development." *National Review of Microbiology* 9 (18): 109–18. doi:10.1128/JB.183.18.5385.
- Church, D, S Elsayed, O Reid, B Winston, and R Lindsay. 2006. "Burn Wound Infections." *Clinical Microbiology Reviews* 19 (2): 403–34. doi:10.1128/CMR.19.2.403.
- Coolen, Neeltje A., Marcel Vlig, Antoon J. Van Den Bogaerdt, Esther Middelkoop, and Magda M W Ulrich. 2008. "Development of an in Vitro Burn Wound Model." *Wound Repair and Regeneration* 16 (4): 559–67. doi:10.1111/j.1524-475X.2008.00403.x.
- Dorsaz, Stephane, Alix T. Coste, and Dominique Sanglard. 2017. "Red-Shifted Firefly Luciferase Optimized for Candida Albicans in Vivo Bioluminescence Imaging." *Frontiers in Microbiology* 8: 1–10. doi:10.3389/fmicb.2017.01478.
- Doyle, Timothy C., Kevin A. Nawotka, Carole Bellinger Kawahara, Kevin P. Francis, and Pamela R. Contag. 2006. "Visualizing Fungal Infections in Living Mice Using Bioluminescent Pathogenic Candida Albicans Strains Transformed with the Firefly Luciferase Gene." *Microbial Pathogenesis* 40 (2): 82–90. doi:10.1016/j.micpath.2005.11.003.
- Gethin, Georgina. 2007. "The Significance of Surface pH in Chronic Wounds." *Wounds UK* 3 (3): 52–56.
- Gow, Neil A. R., Frank L. van de Veerdonk, Alistair J. P. Brown, and Mihai G. Netea. 2011. "Candida Albicans Morphogenesis and Host Defence: Discriminating Invasion from Colonization." *Nature Reviews Microbiology* 10 (2). Nature Publishing Group: 112–22. doi:10.1038/nrmicro2711.
- Gulati, Megha, and Clarissa Nobile. 2016. "Candida Albicans Biofilms: Development, Regulation, and Molecular Mechanisms." *Microbes Infection* 18 (5): 310–21. doi:10.1016/j.micinf.2016.01.002.Candida.
- Hirota, K., H. Yumoto, B. Sapaar, T. Matsuo, T. Ichikawa, and Y. Miyake. 2017. "Pathogenic Factors in Candida Biofilm-Related Infectious Diseases." *Journal of Applied Microbiology* 122 (2): 321–30. doi:10.1111/jam.13330.
- Huebinger, Ryan M., Daniel H. Stones, Marcela de Souza Santos, Deborah L. Carlson, Juquan Song, Diana Pereira Vaz, Emma Keen, Steven E. Wolf, Kim Orth, and Anne Marie Krachler. 2016. "Targeting Bacterial Adherence Inhibits Multidrug-Resistant Pseudomonas Aeruginosa Infection Following Burn Injury." *Scientific Reports* 6 (1). Nature Publishing Group: 39341. doi:10.1038/srep39341.
- Jacobsen, Ilse D., Anja Lüttich, Oliver Kurzai, Bernhard Hube, and Matthias Brock. 2014. "In Vivo Imaging of Disseminated Murine Candida Albicans Infection Reveals Unexpected Host Sites of Fungal Persistence during Antifungal Therapy." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69 (10): 2785–96. doi:10.1093/jac/dku198.
- Kumamoto, Carol A. 2002. "Candida Biofilms." *Current Opinion in Microbiology* 5 (6): 608–11. doi:10.1016/S1369-5274(02)00371-5.
- Kumamoto, Carol A., and Marcelo D. Vences. 2005. "ALTERNATIVE CANDIDA ALBICANS LIFESTYLES: Growth on Surfaces." *Annual Review of Microbiology*

- 59 (1): 113–33. doi:10.1146/annurev.micro.59.030804.121034.
- Mayer, François L, Duncan Wilson, and Bernhard Hube. 2013. "Candida Albicans Pathogenicity Mechanisms." *Virulence* 4 (2): 119–28. doi:10.4161/viru.22913.
- McManus, William F., Cleon W. Goodwin, A.D. Mason, and Basil A. Pruitt. 1981. "Burn Wound Infections." *Journal of Trauma and Acute Care Surgery*.
- Scherer, Stewart, and Paul T Magee. 1990. "Genetics of Candida Albicans." *Microbiological Reviews* 54 (3): 226–41.
- Seneviratne, C. J., L. Jin, and L. P. Samaranayake. 2008. "Biofilm Lifestyle of Candida: A Mini Review." *Oral Diseases* 14 (7): 582–90. doi:10.1111/j.1601-0825.2007.01424.x.
- Tsui, Christina, Eric F. Kong, and Mary Ann Jabra-Rizk. 2016. "Pathogenesis of *Candida Albicans* Biofilm." *Pathogens and Disease* 74 (4): ftw018. doi:10.1093/femspd/ftw018.
- Tsui, Christina, Eric F Kong, and Mary Ann Jabra-rizk. 2016. "Pathogenesis of Candida Albicans Biofilm." *Pathogens and Disease* 74 (January): 1–13. doi:10.1093/femspd/ftw018.
- Vylkova, Slavena, Aaron J. Carman, Heather A. Danhof, John R. Collette, Huaijin Zhou, and Michael C. Lorenz. 2011. "The Fungal Pathogen *Candida Albicans* Autoinduces Hyphal Morphogenesis by Raising Extracellular pH." *mBio* 2 (3): 1–12. doi:10.1128/mBio.00055-11.
- Vylkova, Slavena, and Michael C. Lorenz. 2017. "Phagosomal Neutralization by the Fungal Pathogen *Candida Albicans* Induces Macrophage Pyroptosis." *Infection and Immunity* 85 (2). doi:10.1128/IAI.00832-16.
- Walther, Andrea, and Jürgen Wendland. 2003. *An Improved Transformation Protocol for the Human Fungal Pathogen Candida Albicans*. *Current Genetics*. Vol. 42. doi:10.1007/s00294-002-0349-0.

Selbstständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Jena, den 24.10.2017

Fabian Dressel